



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/31, 15/70, 1/21, C12Q 1/68, C07K 14/22, 16/12, A61K 39/095, 39/40, G01N 33/569	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/11181 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. März 1997 (27.03.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04092 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. September 1996 (18.09.96) (30) Prioritätsdaten: 195 34 579.7 18. September 1995 (18.09.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX- PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEYER, Thomas, F. [DE/DE]; Spemannstrasse 30, D-72076 Tübingen (DE). RUDEL, Thomas [DE/US]; 3946 Camino Calma, La Jolla, CA 92122 (US). SCHEUERPFUG, Ina [DE/DE]; Wernerstrasse 6, D-14193 Berlin (DE). FISCHER, Eckhard [DE/DE]; Forchenweg 9, D-72076 Tübingen (DE). MAIER, Jürgen [DE/DE]; Kehlstrasse 9, D-73257 Köngen (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES WHICH CODE PROTEINS WHICH MEDIATE THE ADHESION OF NEISSERIA CELLS TO HUMAN CELLS (54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE-MOLEKÜLE CODIEREND PROTEINE, DIE DIE ADHÄSION VON NEISSERIA-ZELLEN AN HUMANE ZELLEN VERMITTELN (57) Abstract <p>The invention relates to nucleic acid molecules which code proteins which mediate the adhesion of bacteria from the genus <i>Neisseria</i> to human cells. It also relates to the proteins coded by these nucleic acid molecules and antibodies against said proteins, and to drugs, vaccines and diagnostic compositions which contain the nucleic acid molecules, proteins and/or antibodies.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden Nucleinsäure-Moleküle beschrieben, die Proteine codieren, die die Adhäsion von Bakterien der Gattung <i>Neisseria</i> an humane Zellen vermitteln. Ferner werden die durch diese Nucleinsäure-Moleküle codierten Proteine und gegen sie gerichtete Antikörper beschrieben. Weiterhin werden Arzneimittel, Impfstoffe und diagnostische Zusammensetzungen beschrieben, die die Nucleinsäure-Moleküle, Proteine und/oder Antikörper enthalten.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Nucleinsäure-Moleküle codierend Proteine, die die Adhäsion
von Neisseria-Zellen an humane Zellen vermitteln**

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäure-Moleküle aus Bakterien der Gattung *Neisseria*, die Proteine codieren, die die Adhäsion von *Neisseria*-Zellen an humane Zellen vermitteln. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die durch diese Nucleinsäure-Moleküle codierten Proteine und gegen diese gerichtete Antikörper. Die Erfindung betrifft weiterhin Arzneimittel, Impfstoffe und diagnostische Zusammensetzungen, die die beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle, Proteine und/oder Antikörper enthalten.

Der Gattung *Neisseria* (gramnegative Kokken) gehören eine Reihe von Bakterienarten an, die als Saprophyten den oberen Respirationstrakt des Menschen besiedeln. Neben kommensalen Arten (e.g.: *N. sicca*) und opportunistisch pathogenen Arten (e.g.: *N. lactamica*) sind zwei *Neisseria*-Arten bekannt, welchen eindeutig humanpathogene Eigenschaften zuzuschreiben sind. Es handelt sich hierbei um die ausschließlich beim Menschen vorkommenden Arten *N. gonorrhoeae*, dem Erreger der gleichnamigen venerischen Erkrankung Gonorrhoe, sowie um *N. meningitidis*, dem Erreger der bakteriellen epidemischen Hirnhautentzündung. In beiden Fällen ist die Ätiologie, d.h. der kausale Zusammenhang zwischen Entstehung des Krankheitsbildes und Besiedelung durch Bakterien der genannten Arten hinlänglich gesichert.

Bei der durch *N. meningitidis* ("Meningokokkus") verursachten eitrigen Hirnhautentzündung (*Meningitidis cerebrospinalis epidemica*), die meist epidemisch auftritt, handelt es sich um eine systemische invasive Infektion der Hirn- und Rückenmarkshäute des Menschen. Gelegentlich werden zusätzlich hämorrhagische Exantheme am Rumpf, bzw. Begleiterkrankungen

durch Herpes simplex beobachtet. Der Erreger kann in mehreren Serovars auftreten, die mittels Agglutinationsreaktionen mit Immunseren unterscheidbar sind. Die Hauptgruppen sind dabei bemerkenswert verschieden und kommen in räumlich und zeitlich unterschiedlicher Prävalenz vor. Meningokokken-Meningitidis trat bislang gehäuft alle 8 bis 12 Jahre auf mit einer Dauer der erhöhten Prävalenz von etwa 4 bis 6 Jahren. Während in den USA, sowohl bei der Zivilbevölkerung, als auch bei Militärpersonal, Serovar B Meningokokken 50% bis 55% der rezenten Erkrankungen auslösten, wurden in der ersten Hälfte des Jahrhunderts die meisten Epidemien in den USA durch Serovar A Meningokokken verursacht.

Das von *N. gonorrhoeae* verursachte Krankheitsbild ist meist eine lokal begrenzte Infektion der Schleimhäute vor allem des Urogenitaltrakts (Gonorrhoe), seltener der Konjunktiva (Conjunctivitis gonorrhoeae, Gonoblennorrhoe), die bei Neugeborenen perinatal, bei Erwachsenen meist einseitig über Schmierinfektion erworben wird. In sehr seltenen Fällen kommt es nach hämatogener Aussaat zu Bakteriämie und Sepsis, die Exantheme mit hämorrhagischen Pusteln und Folgeerkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Arthritis gonorrhoeica und/oder Endokarditis nach sich ziehen können.

Die Erkrankungen durch *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* werden üblicherweise mit Antibiotika therapiert. In zunehmendem Maße treten jedoch Resistenzen gegen einzelne oder Gruppen der verwendeten Antibiotika auf, so daß die Verfügbarkeit der bislang nahezu ausschließlich praktizierten Therapiemethode eine ungünstige Prognose hat. Die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden, vorzugsweise präventiver Art, ist deshalb wünschenswert und dringlich.

Neisseria gonorrhoeae und *N. meningitidis* kommen ausschließlich beim Menschen vor und weisen in Anpassung an ihren einzigen Wirtsorganismus eine Vielzahl von Eigenschaften auf, die geeignet sind, die Abwehrmechanismen des Wirts wirkungslos zu machen. So ist bis heute kein Impfstoff verfügbar, der Gonorrhoe verhindert. Dies gilt in eingeschränkter Form auch für die Meningokokken-Meningitis. Obwohl die Erkrankung

in jüngerer Zeit vorwiegend durch Bakterien desselben Serovars, Gruppe B, verursacht wird, ist ein wirksamer Impfstoff gegen Gruppe B Meningokokken bislang nicht existent. Impfstoffe gegen andere Serovars bieten nur partiellen Schutz und sind aus immunologischer Sicht nicht unproblematisch. Ursächlich für das Versagen der Immunabwehr ist unter anderem die antigene Variation auf der Erregerseite, die im Falle der pathogenen Neisserien besonders ausgeprägt ist. Eine Einschränkung des Freiraums der antigenen Variation ist jedoch dort denkbar, wo die sterische Aufrechterhaltung eines funktionellen Bereichs erforderlich ist, um die Interaktion mit weitgehend konservierten und konstanten Strukturen der Wirtsrezeptoren zu gewährleisten. Im Falle der Adhäsine, die zur Anheftung an die Wirtszelle dienen, ist diese Forderung in besonderem Maß zutreffend. Nur bei weitgehender Konstanzhaltung des funktionellen an der physikalischen Interaktion beteiligten Bereichs ist die Wechselwirkung mit dem Rezeptor der Wirtszelle möglich. Dieser Bereich sollte damit antigenen Variation weitgehend verschlossen sein und stellt damit einen geeigneten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiemethoden dar.

Bei einer Infektionserkrankung ist allgemein die stabile Anheftung der Erreger an Wirtsgewebe als Initialphase anzusehen. Durch Wechselwirkungen zwischen Strukturen der Zelloberflächen von Erreger und Wirtszelle wird eine mechanisch stabile Verbindung geschaffen, die ein Verweilen der Bakterien auf dem Gewebe des Wirts (Kolonisierung) und nachfolgende lokale Vermehrung der Erreger ermöglicht. Die Anheftung an die Wirtszelle ist in zwei Abschnitte gliederbar, wobei unterschiedliche Strukturen an der Wechselwirkung beteiligt sind.

Die erste Etappe der Adhäsion ist die Vermittlung eines Kontaktes zwischen Wirts- und Erregerzelle. Vielfach erfolgt die Kontaktaufnahme unter Beteiligung von Zellankern-Organellen, den sogenannten Pili. Diese auch Fimbrien oder Fibrillen genannten Zellorganellen sind wenige bis mehrere

feine fadenförmige starre oder flexible Anhängsel der Bakterienzelle, deren Länge ein mehrfaches des Zelldurchmessers betragen kann. Bei der pilusvermittelten Adhäsion besteht deshalb noch kein Kontakt zwischen den Zellwänden von Erreger und Wirtszelle. Die Mehrzahl der bekannten Pili sind heteropolymere Strukturen, die aus verschiedenen Komponenten bestehen. Die meist in hoher Kopienzahl vorliegende Hauptuntereinheit erfüllt die Struktur- bzw. Gerüstfunktion, während die eigentliche Adhäsinfunktion von Nebenkomponten getragen wird mit meist sehr niedriger Kopienzahl.

Bei einer weiteren Form der Adhärenz erfolgt die Anheftung von Erregern an die Wirtszellen ohne die Beteiligung von Pili (pilus independent adherence, pia). Hierbei kommt es nach räumlicher Annäherung zwischen Erreger- und Wirtszelle zur direkten Berührung der Zellwände. Diese Anlagerung und Stabilisierung des Zell-Zellkontaktes erfolgt unter Beteiligung von Adhäsinen, die in der Bakterienzellwand lokalisiert sind. Durch den direkten Zell-Zellkontakt kommt es schließlich zur Signalübertragung, welche die Erreger-induzierte Phagozytose einleitet und den Invasionsvorgang in die Zielzelle startet. Die pia Form der Adhärenz kann autonom die Anheftung der Erreger bewirken, beispielsweise bei piluslosen Erregern. Sie kann aber auch als zweite Phase der Anheftung, d.h. als Folgereaktion nach pilusvermittelter Anheftung den Zell-Zellkontakt stabilisieren. Die Adhäsine, die an der pilusunabhängigen Adhäsion beteiligt sind, können, aber müssen nicht andere Bindespezifitäten aufweisen, als die an der pilusabhängigen Adhäsion beteiligten Adhäsine.

Im Sinne der Erfindung werden nachfolgend die an der Anheftung beteiligten Strukturen der Bakterien als Adhäsine, die der Wirtszelle als Rezeptoren bezeichnet. Unterbleibt der Kontakt zwischen Adhäsine und Rezeptor, so bewirken "Abwehrmechanismen" des Wirts wie Flimmerbewegung der Epithelien, Mucusabsonderung, Massenströmungen von Körperflüssigkeiten u.a.m. die Elimination der Erreger. Die Entstehung einer Infektionserkrankung wird damit bereits im Vorfeld unterbun-

den. Eine Störung der Erregeranheftung durch Hemmung der Wechselwirkung zwischen Adhäsine und Rezeptor der Zielzelle stellt somit einen sehr wirkungsvollen Ansatz für die Prävention und Therapie von Infektionserkrankungen dar. Derartige therapeutisch wirksame Ansätze beinhalten die Bildung von Antikörpern, die spezifisch die Adhäsinfunktion blockieren, sei es durch aktive Immunisierung (Vakzinierung), oder durch Verabreichung bereits gebildeter Antikörper (passive Immunisierung). Eine Hemmung der Adhäsine-Rezeptor Bindung läßt sich ebenfalls mittels passiver Verabreichung sowohl von rezeptoranalogen, als auch von adhäsineanalogen Substanzen erzielen. Diese Stoffe binden kompetitiv an die jeweilige Partnerstruktur und blockieren diese damit für produktive Interaktionen. Solche Stoffe werden im Sinne der Erfindung als Inhibitoren bezeichnet.

Bislang durchgeführte Ansätze, unter Verwendung von Pilin, der Strukturfunktion tragenden Hauptkomponente des Pilus, eine breit wirksame Vakzine zu entwickeln, welche die Adhäsion von pathogenen Neisserien wirksam blockiert, schlugen fehl. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß (i) Pilin selbst keine Adhäsinfunktion trägt und (ii) Pilin in besonders ausgeprägter Form intra- und interstammsspezifische antigene Variation aufweist. Da beide Einschränkungen, wie oben dargelegt, für Adhäsine nicht gelten, sollte bei Verwendung eines Adhäsins als Vakzine diesem Ansatz eher Erfolg beschieden sein.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Proteine und diese codierende DNA-Moleküle zur Verfügung zu stellen, die als Adhäsionsstrukturen bei Neisseria Spezies dienen oder zur Ausbildung solcher Strukturen beitragen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder Teile davon enthalten, wobei diese Nucleinsäure-Moleküle einen oder mehrere offene Leserahmen umfassen, die Proteine oder biologisch aktive Fragmente davon aus Bakterien der Gattung *Neisseria* codieren, die die Adhäsion von *Neisseria*-Zellen an humane Zellen vermitteln. Der Begriff "Leserahmen" wird hierbei synonym verwendet mit dem Begriff "codierende Region".

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Nucleinsäure-Moleküle, die im Prinzip die in Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz aufweisen, bei denen jedoch die Nucleotidsequenzen der offenen Leserahmen aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von denen der in Seq ID No. 1 angegebenen abweicht. Vorzugsweise weisen bei diesen Nucleinsäure-Molekülen die offenen Leserahmen Nucleotidsequenzen auf, die Proteine mit einer der unter Seq ID No. 1 angegebenen Aminosäuresequenzen codieren.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Nucleinsäure-Moleküle, die mit den vorangehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen hybridisieren und codierende Regionen umfassen, die Proteine codieren, die die Adhäsion von *Neisseria*-Zellen an humane Zellen vermitteln.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Hybridisierung" verwendet, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101 bis 1.104) beschrieben. Vorzugsweise wird darunter eine Hybridisierung unter stringenten Bedingungen verstanden. Darunter wird insbesondere eine Hybridisierung verstanden, bei der nach Waschen für 1 h mit 1 x SSC und 0,1 % SDS, vorzugsweise mit 0,2 x SSC und 0,1 % SDS, bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform stammt das erfindungsgemäße Nucleinsäure-Molekül aus einer pathogenen *Neisserien*

Spezies, insbesondere aus *Neisseria gonorrhoeae* oder *Neisseria meningitidis*.

Der Begriff "Nucleinsäure-Molekül", wie hier erfindungsgemäß verwendet, bezieht sich auf eine polymere Form von Nucleotiden beliebiger Länge, entweder, als Ribonucleotide oder als Desoxyribonucleotide. Der Begriff bezieht sich lediglich auf die Primärstruktur des Moleküls. Sinngemäß umfaßt er folglich DNA- und RNA-Moleküle in Einzelstrang- oder Doppelstrangform. Bei der DNA kann es sich sowohl um cDNA als auch um genomische DNA handeln. Der Begriff umfaßt ferner die nicht modifizierte Form ebenso wie wissenschaftlich bekannte Arten der Modifikationen, z.B. Methylierung, "capping", Basensubstitution mit natürlichen oder synthetischen Analogen, Internucleotid-Modifikationen mit ungeladenen Verbindungen (z.B. Methyl-Phosphat, Phosphoamidat, Carbamat, Phosphotriester u.a.m.) oder mit geladenen Verbindungen (z.B. Phosphorothioat, Phosphorodithioat u.a.m.) oder mit Bindegliedern wie Proteinen und Peptiden (z.B. Nucleasen, Toxine, Antikörper, poly-L-Lysin u.a.m.). Der Begriff umfaßt auch Formen mit Intercalatoren (z.B. Acridin, Psoralen u.a.m.), Chelatoren (z.B. mit Metallen, radioaktiven Metallen oder oxidierenden Metallen, u.a.m.), solche mit alkylierenden Agentien und schließlich mit modifizierten Bindungen (z.B. alpha anomere Nucleinsäuren u.a.m.).

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vektoren, die ein erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Molekül enthalten. Bei dem Vektor kann es sich um einen beliebigen prokaryontischen oder eukaryontischen Vektor handeln. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind chromosomale Vektoren, wie etwa Bakteriophagen (z.B. Bakteriophage Lambda, P1) und extrachromosomale Vektoren, wie etwa Plasmide, wobei zirkuläre Plasmidvektoren besonders bevorzugt sind. Geeignete prokaryontische Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook et al. (s.o.), Kapitel 1 bis 4, beschrieben. Der erfindungsgemäße Vektor kann auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor oder

ein für höhere Zellen geeigneter Vektor (z.B. ein Plasmidvektor, ein viraler Vektor, ein Pflanzenvektor, u.a.m.). Beispiele für derartige Vektoren sind ebenfalls in Sambrook et al. (s.o., Kapitel 16) beschrieben. Ein Vektor, der ein erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Molekül enthält, ist beispielsweise das Plasmid pES25 (enthalten im E. coli Stamm H 2560 (DSM 10257)). Der E. coli-Stamm H 2560 wurde am 18. September 1995 entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland unter der Hinterlegungsnummer DSM 10257 hinterlegt.

Ferner betrifft die Erfindung Wirtszellen, die einen oben beschriebenen Vektor enthalten oder mit einem oben beschriebenen Nucleinsäuremolekül genetisch manipuliert sind. Der Begriff "Wirtszelle" umfaßt im Rahmen dieser Erfindung sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Wirtszellen. Prokaryontische Zellen sind bevorzugt, dabei besonders gram-negative prokaryontische Zellen, insbesondere E. coli-Zellen. Als eukaryontische Wirtszellen kommen beispielsweise Pilzzellen (z.B. Hefezellen), tierische oder pflanzliche Zellen in Frage.

Die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz umfaßt drei offene Leserahmen. Diese stellen ein Operon dar, das eine funktionelle Einheit bildet. Die drei offenen Leserahmen, die als orfI, orfA und orfB bezeichnet werden, codieren drei Proteine, die im Rahmen dieser Erfindung als OrfI, OrfA und OrfB bezeichnet werden. Diese Sequenzen sind in Neisserien verantwortlich für die Expression eines Proteins, insbesondere des Proteins OrfA, das eine Funktion bei der Adhäsion von Neisseria-Zellen an humane Zellen besitzt. Die Proteine OrfI und OrfB besitzen offensichtlich Regulator-

funktion bzw. eine Funktion als Faktoren, die die Funktionalität von OrfA beeinflussen können.

Dieses Nucleinsäure-Molekül stellt somit eine Region des Neisserien-Genoms dar, die Proteine mit Adhäsion-Funktion von Neisserien codiert.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung somit auch Nucleinsäure-Moleküle, die ein Lipoprotein oder biologisch aktive Fragmente davon von Bakterien der Gattung Neisseria codieren, das die unter Seq ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz von dem Aminosäurerest 19 bis zu dem Aminosäurerest 320 der in Seq ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist. Bevorzugt besitzen derartige Nucleinsäure-Moleküle die unter Seq ID No. 2 dargestellte Nucleotidsequenz, insbesondere die Nucleotidsequenz von Nucleotid 189 bis Nucleotid 1095 der in Seq ID No. 2 dargestellten Sequenz.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäure-Moleküle, die ein Lipoprotein aus Bakterien der Gattung Neisseria codieren und deren Nucleotidsequenz von der der vorgehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle aufgrund der Degeneration des genetischen Codes abweicht.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, die ein Lipoprotein von Bakterien der Gattung Neisseria codieren und die mit einem der vorgehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle hybridisieren (für die Definition des Begriffs "Hybridisierung" s.o.).

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Fragmente, Derivate und alle Varianten der oben beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle, die das oben genannte Lipoprotein codieren. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäure-Moleküle verstanden, die lang genug sind, um das beschriebene Protein zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Nucleotidsequenzen dieser Moleküle sich von

den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu dieser Nucleotidsequenz aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäure-Molekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäure-Molekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen sind und Derivate dieser Nucleinsäure-Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Moleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

Vorzugsweise weisen die von den erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Molekülen codierten Proteine eine Homologie von 80 %, besonders bevorzugt von über 90 % zu der unter Seq ID No. 2 dargestellten Nucleotidsequenz auf.

Die vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle codieren ein Lipoprotein aus Bakterien der Gattung Neisseria. Dieses Protein wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung als OrfA bezeichnet. Dieses Protein ist experimentellen Daten zufolge auf der Zelloberfläche von Neisserien lokalisiert, insbesondere auf der äußeren Membran. Das Protein weist vorzugsweise ein Molekulargewicht von ca. 36 kD auf, wenn es im T7-Expressionssystem analysiert wird. Ferner besitzt dieses Protein eine biologische Aktivität, die die Adhäsion von Neisseria-Zellen an humane Zellen vermittelt. Dies erfolgt insbesondere dadurch, daß dieses Protein mit dem als PilC bekannten Protein aus Neisseria einen Komplex bildet. Die Adhäsion findet dabei bevorzugt auf humanen Epithelzellen statt.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, die die vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle enthalten. Beispiele für derartige Vektoren wurden bereits oben beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind in derartigen Vektoren die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Expression des Proteins in pro- oder eukaryontischen Zellen ermöglichen. Darunter werden im Rahmen dieser Erfindung beispielsweise Promotoren, Operatoren, Enhancer u.ä. verstanden.

Ferner betrifft die Erfindung Wirtszellen, die vorstehend beschriebene erfindungsgemäße Vektoren enthalten oder mit den vorstehend beschriebenen Nucleinsäuremolekülen genetisch manipuliert sind. Genetisch manipuliert bedeutet dabei, daß in die Wirtszelle oder in eine Vorgängerzelle ein derartiges Molekül mittels (gen)technischer Methoden eingeführt wurde.

Als Wirtszellen kommen wiederum die oben beschriebenen in Frage.

Ebenso betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung des beschriebenen Lipoproteins oder eines biologisch aktiven Fragmentes davon, bei dem die oben beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen kultiviert werden, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturüberstand isoliert wird.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Proteine, die von einem der vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle codiert werden, sowie biologisch aktive Fragmente davon, sowie Proteine, die durch das vorangehend beschriebene Verfahren erhältlich sind. Insbesondere betrifft die Erfindung auch Proteine, die mit den beschriebenen Proteinen immunologisch kreuzreagierende Aminosäuresequenzen aufweisen. Der Begriff "Protein" umfaßt im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch natürlich vorkommende Varianten oder Modifikationen oder Fragmente, bzw. synthetisch hergestellte Modifikationen, Varianten oder Fragmente mit entsprechender biologischer Aktivität. Abgeleitete oder rekombinante Proteine müssen nicht notwendigerweise auf biologischem Weg von der Nucleotidsequenz übersetzt werden. Sie können auf beliebige Art hergestellt werden, einschließlich chemischer Synthese, in vitro Synthese mittels eines Expressionssystems oder durch Isolierung aus Organismen. Erfindungsgemäße Proteine können auch eine oder mehrere Aminosäureanaloge oder nicht natürlich vorkommende Aminosäuren enthalten. Ebenso können Modifikationen (z.B. Glykosylierung, u.a.m.) oder Markierung (z.B. Biotinylierung, u.a.m.) nach wissenschaftlichem Kenntnisstand enthalten sein.

Die Fragmente haben vorzugsweise eine Mindestlänge von 3 bis 5 Aminosäuren, besonders bevorzugt von 8 bis 10 Aminosäuren und insbesondere von 11 bis 15 Aminosäuren. Das vorstehende trifft auch auf die weiter unten beschriebenen erfindungsgemäßen Proteine zu.

Das erfindungsgemäße Lipoprotein OrfA läßt sich beispielsweise durch ein Verfahren reinigen, das auf der Wechselwirkung dieses Proteins mit dem PilC-Protein aus *Neisseria gonorrhoeae* beruht. Die Reinigung erfolgt dabei vorzugsweise aus Homogenaten von Zellen, die dieses Protein exprimieren, mittels Chromatographie-Matrizes, die immobilisiertes PilC-Protein enthalten. Das Protein läßt sich dann unter Ausnutzung der Affinität zu PilC selektiv eluieren und in wesentlich reiner Form darstellen.

Die erfindungsgemäßen Proteine oder Fragmente davon können als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch Antikörper, die gegen ein erfindungsgemäßes Protein oder ein Fragment davon gerichtet sind. Die Antikörper können sowohl polyclonal als auch monoclonal sein. Verfahren zur Herstellung derartiger Antikörper sind dem Fachmann geläufig.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind derartige Antikörper gegen Epitope des erfindungsgemäßen Proteins oder Fragmente davon gerichtet, die für die Adhärenz und für die Interaktion mit PilC wesentlich sind.

Die Erzeugung der erfindungsgemäßen Antikörper kann beispielsweise auch dadurch erfolgen, daß die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen durch in vivo Transfektion in Wirte eingebracht werden. Dadurch kommt es in dem Wirt zur Expression des Proteins oder eines Fragmentes davon und zur Induktion von dagegen gerichteten Antikörpern (Nucleinsäure-Vakzinierung). Dies gilt auch für die weiter unten beschriebenen Antikörper.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nucleinsäure-Moleküle, die mindestens 12 Nucleotide lang sind und die spezifisch mit einem vorangehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekül hybridisieren. Vorzugsweise weisen derartige Nucleinsäure-Moleküle eine Mindestlänge von 15 Nucleotiden, beson-

ders bevorzugt von 20 Nucleotiden auf. Solche Moleküle eignen sich beispielsweise als Primer für in vitro Amplifikation, z.B. mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), oder zur Diagnose, d.h. zum spezifischen Nachweis der erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Moleküle in Proben.

Ferner betrifft die Erfindung Arzneimittel, die ein vorstehend beschriebenes erfindungsgemäßes Nucleinsäure-Molekül, Protein, ein biologisch aktives Fragment davon und/oder einen oben beschriebenen erfindungsgemäßen Antikörper enthalten. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können derartige Arzneimittel gegebenenfalls die üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Zusatz- und/oder Trägerstoffe enthalten. Ebenso betrifft die Erfindung Impfstoffe, die vorstehend beschriebene Nucleinsäure-Moleküle, Proteine, biologisch aktive Fragmente davon und/oder Antikörper enthalten.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäure-Moleküle, Proteine, biologisch aktive Fragmente davon und/oder Antikörper enthalten.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Rezeptoren und Stoffe mit Rezeptorfunktion, die als Liganden mit dem erfindungsgemäßen Adhäsion, dem OrfA-PilC-Komplex interagieren. Solche Stoffe sind aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem OrfA-PilC-Komplex als kompetitive Hemmstoffe der Adhärenzfunktion identifizierbar. Dabei kann es sich um Oberflächenkomponenten von humanen Zellen, in einer besonders bevorzugten Form um Oberflächenkomponenten von humanen Epithelzellen oder um chemische Substanzen beliebiger Herkunft handeln.

Schließlich betrifft die Erfindung Inhibitoren, welche die Wechselwirkung zwischen dem OrfA-PilC-Adhäsion-Komplex und

seinen Rezeptoren beeinflussen. Darin enthalten sind alle erfindungsgemäßen Substanzen, welche die Interaktion zwischen dem OrfA-PilC Adhäsion und seinem zellulären Rezeptor beeinflussen und damit die Adhärenz stören. In einer besonders bevorzugten Form sind darin irreversibel an den Adhäsion-Komplex bindende Stoffe wie etwa Rezeptoranaloga enthalten.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die als Wirkstoff

- (a) einen erfindungsgemäßen Rezeptor;
- (b) ein erfindungsgemäßes Rezeptoranalog; und/oder
- (c) einen erfindungsgemäßen Inhibitor

enthalten, gegebenenfalls zusammen mit den üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Zusatz- und Trägerstoffen.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzungen können einerseits zur Identifizierung und Charakterisierung einer nicht bekannten Bakterienprobe als pathogene *Neisseria* spc., andererseits auch zur Diagnostik einer *Neisseria* Infektion verwendet werden.

Auf Polynucleotidebene erfolgt die Verwendung vorzugsweise über Hybridisierungs sonden, welche erfindungsgemäße Nucleotidsequenzen umfassen, die für einen der orf-Genbereiche spezifisch sind, oder durch die Verwendung erfindungsgemäßer Nucleotidsequenzen aus einem der orf-Genbereiche als Primer für die PCR-Amplifikation des nachzuweisenden, für pathogene *Neisserien* spezifischen genomischen DNA Abschnitts.

Auf Polypeptidebene erfolgt die Diagnostik vorzugsweise mit Hilfe der erfindungsgemäßen Antikörper, bzw. bei Antikörper-suchtests mit Hilfe der erfindungsgemäßen immunogenen Proteine oder Fragmenten davon.

Rezeptoren, rezeptoranaloga Substanzen und Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen erfindungsgemäßigem OrfA und zugehörigen Rezeptoren der Wirtszellen können Anwendung finden als Therapeutikum bei bestehender Infektion im Frühstadium, oder bei Verdacht auf Infektion. Durch nachhaltige Hemmung der

Adhärenz kann die Anheftung der Erreger an Wirtsepithelien verhindert werden, so daß vermittels der üblichen Abwehrmechanismen wie Flimmerbewegung der Epithelien, Mucusabsonderung, Massenströmungen von Körperflüssigkeiten u.a.m. die Erreger eliminiert werden.

Schließlich können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen auch zur Prävention oder Bekämpfung von Neisseria Infektionen verwendet werden. Vorzugsweise werden für präventive Anwendungen die erfindungsgemäßen Proteine oder Teile davon zur Herstellung eines Impfstoffs für aktive Immunisierung, oder erfindungsgemäße Antikörper zur Herstellung eines als Therapeutikum einsetzbaren passiven Impfstoffs verwendet. Die vorstehend erläuterten Verwendungsmöglichkeiten treffen auch auf die weiter unten beschriebenen Arzneimittel und diagnostischen Zusammensetzungen zu.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nucleinsäure-Moleküle, die ein Protein oder ein biologisch aktives Fragment davon aus Bakterien der Gattung Neisseria codieren, wobei dieses die unter Seq ID No. 3 dargestellte Aminosäuresequenz hat. Derartige Nucleinsäure-Moleküle haben vorzugsweise die unter Seq ID No. 3 dargestellte Nucleotidsequenz, insbesondere die der angegebenen codierenden Region. Ebenso betrifft die Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, deren Sequenz von den Sequenzen der obengenannten Moleküle aufgrund der Degeneration des genetischen Codes abweicht. Ferner sind auch Gegenstand der Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, die mit den vorstehend genannten Nucleinsäure-Molekülen hybridisieren (für die Definition des Begriffs "Hybridisierung" siehe oben). Für die möglichen Variationen der Nucleinsäure-Moleküle gilt, was bereits im Zusammenhang mit den für OrfA codierenden Nucleinsäure-Molekülen ausgeführt wurde.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vektoren, die die beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle enthalten, insbesondere solche, in denen sie mit regulatorischen DNA-Elementen zur Expression in pro- oder eukaryontischen Zellen verknüpft sind, so-

wie Wirtszellen, die derartige Vektoren enthalten oder die mit den beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen genetisch manipuliert sind.

Ebenso betrifft die Erfindung Proteine, die von den vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen codiert werden und Proteine, die Aminosäuresequenzen enthalten, die mit der in Seq ID No. 3 dargestellten Aminosäuresequenz oder Teilen davon immunologisch kreuzreagieren. Diese werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als OrfI-Proteine bezeichnet. Das Protein aus *Neisseria gonorrhoeae*, das die unter Seq ID No. 3 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, zeigt im T7-Expressionssystem ein apparentes Molekulargewicht von ca. 18 kD. Eine Homologie zu bisher bekannten Proteinen konnte nicht nachgewiesen werden. Experimentelle Daten deuten darauf hin, daß das Protein intrazellulär lokalisiert ist und eventuell eine Regulatorfunktion besitzt.

Hergestellt werden kann dieses Protein durch ein Verfahren, bei dem eine vorstehend beschriebene Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturüberstand gewonnen wird. Somit betrifft die Erfindung auch Proteine, die durch ein solches Verfahren erhältlich sind.

Die Erfindung betrifft ebenso Antikörper gegen ein vorstehend beschriebenes Protein oder Fragment davon, sowie Nucleinsäure-Moleküle, die eine Länge von mindestens 12 Nucleotiden aufweisen und die spezifisch mit einem vorangehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekül hybridisieren. Vorzugsweise sind solche Moleküle länger als 15 Nucleotide und besonders bevorzugt länger als 20 Nucleotide.

Die Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, die ein vorstehend beschriebenes Nucleinsäure-Molekül, Protein, biologisch aktives Fragment davon und/oder Antikörper enthalten und gegebenenfalls pharmazeutisch verträgliche Trägerstoffe.

Gegenstand der Erfindung sind auch diagnostische Zusammensetzungen, die vorstehend beschriebene Nucleinsäure-Moleküle, Proteine, biologisch aktive Fragmente davon und/oder Antikörper enthalten

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nucleinsäure-Moleküle, die ein Protein oder ein biologisch aktives Fragment davon aus Bakterien der Gattung *Neisseria* codieren, wobei dieses die unter Seq ID No. 4 dargestellte Aminosäuresequenz hat. Derartige Nucleinsäure-Moleküle haben vorzugsweise die unter Seq ID No. 4 dargestellte Nucleotidsequenz, insbesondere die der angegebenen codierenden Region. Ebenso betrifft die Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, deren Sequenz von der Nucleotidsequenz der obengenannten Moleküle aufgrund der Degeneration des genetischen Codes abweicht. Ferner sind auch Gegenstand der Erfindung Nucleinsäure-Moleküle, die mit den vorstehend genannten Nucleinsäure-Molekülen hybridisieren (für die Definition des Begriffs "Hybridisierung" siehe oben). Für die möglichen Variationen der Nucleinsäure-Moleküle gilt dasselbe, was bereits im Zusammenhang mit den für OrfA codierenden Nucleinsäure-Molekülen ausgeführt wurde.

In einer bevorzugten Ausführungsform codieren die vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle ein Protein, das in der Lage ist, mit dem Protein PilC einen Komplex zu bilden und dadurch die Fähigkeit zur Adhärenz an humane Zellen zeigt.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vektoren, die die beschriebenen Nucleinsäure-Moleküle enthalten, insbesondere solche, in denen sie mit regulatorischen DNA-Elementen zur Expression in pro- oder eukaryontischen Zellen verknüpft sind, sowie Wirtszellen die derartige Vektoren enthalten oder die mit den vorangehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen genetisch manipuliert sind.

Ebenso betrifft die Erfindung Proteine, die von den vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekülen codiert werden und Proteine, die Aminosäuresequenzen enthalten, die mit der in Seq ID No. 4 dargestellten Aminosäuresequenz oder Teilen davon immunologisch kreuzreagieren. Diese werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als OrfB bezeichnet. Das Protein aus *Neisseria gonorrhoeae*, das die unter Seq ID No. 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist, zeigt im T7-Expressionssystem ein apparentes Molekulargewicht von ca. 57 kD. Eine Homologie zu bisher bekannten Proteinen konnte nicht nachgewiesen werden. Experimentelle Daten deuten darauf hin, daß das Protein wie OrfA ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert ist und von außen zugänglich ist. Ferner besitzt es offensichtlich auch die Fähigkeit, mit dem Protein PilC einen Komplex zu bilden und alleine oder in Kombination mit OrfA die Adhäsion an humane Zellen zu vermitteln.

Hergestellt werden kann dieses Protein durch ein Verfahren, bei dem eine vorstehend beschriebene Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert wird, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturüberstand gewonnen wird. Somit betrifft die Erfindung auch Proteine, die durch ein derartiges Verfahren erhältlich sind.

Die Erfindung betrifft ebenso Antikörper gegen ein vorstehend beschriebenes Protein oder Fragment davon, sowie Nucleinsäure-Moleküle, die eine Länge von mindestens 12 Nucleotiden aufweisen und die spezifisch mit einem vorstehend beschriebenen Nucleinsäure-Molekül hybridisieren. Vorzugsweise sind solche Moleküle länger als 15 Nucleotide und besonders bevorzugt länger als 20 Nucleotide.

Ferner betrifft die Erfindung Arzneimittel, die ein vorstehend beschriebenes Nucleinsäure-Molekül, Protein, biologisch aktives Fragment davon und/oder Antikörper enthalten und gegebenenfalls pharmazeutisch verträgliche Trägerstoffe.

Gegenstand der Erfindung sind auch diagnostische Zusammensetzungen, die vorstehend beschriebene Nucleinsäure-Moleküle, Proteine, Fragmente davon und/oder Antikörper enthalten

Erläuterungen zu den Figuren und Sequenzprotokollen:

Figur 1 zeigt schematisch den Aufbau des Plasmids pES25.

Figur 2 zeigt die Nucleotidsequenz (SEQ ID No. 1) des *orf* Genbereichs, beginnend mit Position 1 an der modifizierten BglI-Schnittstelle und endend mit Position 3260, des letzten Nucleotids der HindIII-Schnittstelle. Restriktionsschnittstellen, Ribosomenbindestellen (Shine-Dalgarno-Sequenzen) und Promotor-Sequenzen (-35- und -10-Regionen) sind gekennzeichnet. SEQ ID No. 1 zeigt ferner die Aminosäuresequenzen der vom *orf*-Genbereich codierten Proteine OrfI, OrfA und OrfB. Die Aminosäuren der Lipoprotein-Signalsequenz von OrfA sind kursiv geschrieben, die Schnittstelle der Lipoprotein-Signalpeptidase II ist mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Aminosäure Cystein, die den Aminotermius des prozessierten OrfA Lipoproteins darstellt und zu Glyzerylcystein und mit Fettsäure modifiziert wird, ist eingekreist. Die ersten sieben Aminosäuren von OrfB, die Ähnlichkeit mit einer TypIV-Pilin-Signalsequenz aufweisen, sind fettgedruckt. Die Markierungen zwischen Aminosäuren 7 und 8, bzw. 11 und 12 kennzeichnen potentielle Schnittstellen analog zur Prozessierung des TypIV-Pilins.

Seq ID No. 2 zeigt die Nucleotidsequenz des Genbereichs, der OrfA codiert, sowie flankierende Sequenzen. Die

Aminosäuresequenz von OrfA ist ebenfalls angegeben.

Seq ID No. 3 zeigt die Nucleotidsequenz des Genbereichs, der OrfI codiert, sowie flankierende Sequenzen. Die Aminosäuresequenz von OrfI ist ebenfalls angegeben.

Seq ID No. 4 zeigt die Nucleotidsequenz des Genbereichs, der OrfB codiert, sowie flankierende Sequenzen. Die Aminosäuresequenz von OrfB ist ebenfalls angegeben.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiele

Beispiel 1

Methode zur Isolierung des Lipoprotein-Adhäsins OrfA:

Für die Identifizierung des erfindungsgemäßen neuen Adhäsins von *Neisseria gonorrhoeae* erwies sich eine Beobachtung bei der chromatographischen Reinigung des PilC Proteins als entscheidend. Hierbei wurde rekombinantes PilC Protein verwendet, das zur Erleichterung der chromatographischen Aufreinigung durch einen Oligo-Histidin Bereich mit sechs Histidinresten (His₆-tag) erweitert wurde (Rudel et al., Nature 357-359, 1995). Die Erweiterung des Proteins um das Histidinhexapeptid ermöglicht die selektive Bindung an eine Nickel-Nitrilotriacetat-Agarosematrix (Ni-NTA-Matrix). Nach Extraktion der Zellwandfraktion, hergestellt aus Kulturen eines piluslosen PilC-Überproduzentenstamms N560 (Rudel et al., s.o.) von *Neisseria gonorrhoeae*, wurde folglich das Extrakt auf eine Ni-NTA-Chromatographie Matrix aufgetragen. Üblicherweise wurde bei dem zur Reinigung von rekombinantem PilC entwickelten Verfahren unspezifisch gebundenes Material

durch ausgiebiges Waschen mit einem imidazolhaltigen Puffer entfernt. Es konnte jedoch in der ersten Elutionsfraktion zusammen mit PilC ein 36 kD Protein (OrfA) in etwa äquimolarem Verhältnis nachgewiesen werden.

Zur Präparation der PilC-OrfA Proteinfraction wurde der Stamm N560 von *Neisseria gonorrhoeae* auf 30 GC-Agar-Platten ausgestrichen und 20 h bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Das GC-Agar-Medium (GC Agar Base, Becton Dickinson, Heidelberg) enthielt die üblichen für das Wachstum von *Neisseria gonorrhoeae* erforderlichen Zusatzfaktoren (0,1 mg Vitamin B12, 10 mg Adenin, 0,3 mg Guanin, 100 mg Glutamin, 1 mg Cocarboxylase, 0,3 mg Thiamin, 259 mg L-Cystein, 11 mg L-Cystin, 1,5 mg Arginin, 5 mg Uracil, 0,2 mg Fe(NO₃)₃, 2,5 mg Diphosphopyridinnucleotid, 0,13 mg p-Aminobenzoesäure und 1 g Dextrose pro 1 Liter Medium), die als Sterilfiltrat dem GC Basismedium nach dessen Hitzesterilisation zugesetzt wurden. Außerdem enthielt das so komplettierte GC-Agar-Medium 5 µg/ml Tetracyclin, und 100 µM IPTG. Die Bakterienrasen wurden mit Wattetupfern abgenommen, in 30 ml Waschpuffer (Tris-HCl pH 8,0 mit 0,15 M NaCl) transferiert und bei 4.000 UpM, 4°C für 15 min zentrifugiert (Du Pont Sorvall Zentrifuge RC-5B, Rotor SS-34). Das Zellsediment wurde erneut in 30 ml Waschpuffer resuspendiert und die Bakterien nach Zugabe von Lysozym und 5 mM EDTA·Na₂ durch Ultraschall-Homogenisation aufgeschlossen. Intakte Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 5.000 UpM, 4°C für 15 min abgetrennt. Die Zellhüllen der lysierten Bakterien wurden durch Zentrifugation des Überstands bei 20.000 UpM, 4°C für 60 min sedimentiert und anschließend in 10 ml Waschpuffer aufgenommen, der zusätzlich 10% Glyzerin, 10 mM MgCl₂ und 2% Triton X-100 enthielt. Nach 45 min Inkubation bei 37°C wurde erneut zentrifugiert (20.000 UpM, 4°C für 60 min) und das Membransediment in 10 ml Waschpuffer mit 10 % Glyzerin, 10 mM MgCl₂, und 2% LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid) suspendiert und bei 37°C für 60 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (20.000 UpM, 4°C für 60 min) wurde der Überstand, der den biologisch

aktiven PilC-OrfA Komplex enthielt zur weiteren Reinigung einer Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie unterzogen. Hierfür wurde Ni-NTA-Gelmatrix (300 ml Bettvolumen) mit 5 Bettvolumina Aqua bidest. gewaschen und danach 10 ml des Überstandes aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Elution mit 5 Säulenvolumina 50 mM Imidazol in PBS Puffer pH 8,0 entfernt. Nach erneutem Waschen der Säule mit 5 bis 10 Bettvolumina 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 mit 0,15 M NaCl (PBS Puffer) wurde der biologisch aktive PilC-OrfA Komplex mit Citrat/Phosphat-Puffer (10 mM Citronensäure, 1 M Natriumphosphat, pH 3,5, 10% Glyzerin, 0,15 M NaCl) in der ersten Elutionsfraktion eluiert und sofort mit einer 1 M Na_2HPO_4 -Lösung neutralisiert. Das Eluat, das PilC und OrfA enthielt wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Beispiel 2

Isolierung der Polynucleotidsequenz, die den orf-Genbereich trägt

Um das 36 kD OrfA Protein näher zu charakterisieren wurden Mäuse mit der PilC-36 kD Proteinfraction immunisiert. Das 36 kD Protein erwies sich dabei als sehr immunogen. Mit Hilfe der so gewonnenen Antikörper wurde eine pBA Plasmid-Genbank des *Neisseria gonorrhoeae* MS11 Genoms in *E. coli* GC1 auf Antigen-Präsenz gescreent. Mehrere Clone mit positiver Reaktion wurden isoliert und Clon H1967 zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

Das Genbankplasmid pES25 (Figur 1) von Clon H1967 enthielt ein genomisches Fragment von etwa 11 kb, cloniert im Vektor pBA. Restriktionsfragmente des Gesamtbereichs wurden subcloniert in pUC- bzw. pBluescript KS (+) -Vektoren. Mit Hilfe von Expression der abgeleiteten Plasmide in Minizellen und Immunoblot Analysen wurden Subclone ausgewählt, die das 36 kD Protein produzierten.

Diese wurden für die Sequenzierung herangezogen. Die Sequenzbestimmung erfolgte durch direkte Sequenzierung von Restriktionsfragmenten, durch Sequenzierung von kontinuierlich verkürzten ExoIII-Nucleasefragmenten des BglI-PstI Fragments (Pos. 1 bis 2560 von Seq ID No. 1), sowie durch Sequenzierung von PCR amplifizierten Fragmenten.

Die in SEQ ID No.1 dargestellte Region von der BglI-Schnittstelle (Pos. 1) bis zur HindIII-Schnittstelle (Pos. 3260) wies drei offene Leseraster mit hoher Codierungswahrscheinlichkeit auf, wobei jedes Leseraster mit dem Startcodon ATG beginnt, in passendem Abstand eine dem Startcodon vorhergehende Ribosomenbindestelle aufweist (S.D.-Sequenz) und mit einem Stopcodon endet.

Die drei Leserahmen weisen dieselbe Orientierung auf. Der erste offene Leserahmen beginnt bei Position 136 der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz und endet bei Position 450 mit dem Stopcodon TAA. Das codierte Protein wurde OrfI genannt und zeigt im T7-Expressionssystem ein apparentes Molekulargewicht von 18 kD. Durch Sequenzvergleich konnten in der EMBL Genbank (Release 43.0 aus 6/95) und in der SwissProt Datenbank (Release 31.0 aus 3/95) weder auf Nucleotidsequenzebene, noch auf Aminosäuresequenzebene signifikante Homologe identifiziert werden.

Der zweite offene Leserahmen beginnt bei Position 583 und endet bei Position 1545 mit dem Stopcodon TGA. Er codiert für das OrfA Protein, das im T7-Expressionssystem ein apparentes Molekulargewicht von 36 kD zeigt. Auch zu dieser Sequenz konnte mittels Datenbanksuche keine signifikanten Homologe aufgefunden werden. Die Sequenzanalyse mittels des Protein Analyse-Programms "Motifs" (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A.) ergab jedoch eine vollständige Homologie des N-Terminus von OrfA mit Lipoprotein-spezifischen Signalsequenzen (Pos. 583 bis 636). Die

Charakterisierung von OrfA als Lipoprotein konnte auf experimentellem Weg bestätigt werden (Vide infra).

Der dritte offene Leserahmen beginnt bei Position 1585 und endet bei Position 3114 mit dem Stopcodon TGA. Das hierdurch codierte Protein, OrfB, weist im T7-Expressionssystem ein apparentes Molekulargewicht von 57 kD. Auch zu diesem Leserahmen konnten durch Datenbanksuche kein Homolog identifiziert werden.

An strukturellen Besonderheiten weist der Aminoterminus der OrfB-Sequenz eine Signalsequenz auf, die Ähnlichkeiten zur Typ IV-Präpilin-Signalsequenz zeigt. An Positionen 8 und 12 der Aminosäuresequenz befindet sich Phenylalanin, so daß zudem zwei potentielle Schnittstellen für die Typ IV-Pilin Signalpeptidase existieren. Es läßt sich hieraus ableiten, daß es sich bei OrfB vermutlich um ein sekretiertes Protein handelt.

Die im T7-Expressionssystem ermittelten Molekulargewichte aller drei Genprodukte stimmen mit den theoretischen aus der Sequenz errechneten Werten überein. Die gelelektrophoretische Trennung der Expressionsprodukte zeigte, daß die OrfB-Bande in allen Fällen deutlich schwächer ausgeprägt war, als die OrfA-Bande. Dies weist auf eine schwächere Expression von OrfB hin.

Zwei Bereiche mit Sequenzhomologie zu Promotorbereichen wurden identifiziert. Der eine liegt vor dem orfI Gen, der zweite vor dem orfA Gen, jeweils in passendem Abstand (SEQ ID No. 1). Es ist somit anzunehmen, daß orfA und orfB eine Transkriptionseinheit bilden.

Die Analyse des *Neisseria gonorrhoeae* MS11 Genoms nach ClaI und MluI Verdau zeigte in Southern Hybridisierung mit Plasmid pES-8 als Probe ein komplexes Bandenmuster. Dies weist auf die Existenz mehrerer Kopien des orf-Genbereichs, ver-

mutlich drei Kopien, im Genom von *Neisseria gonorrhoeae* MS11 hin. Ob alle diese Loci exprimiert sind, ob sie antigener Variation unterliegen wie beispielsweise die *Neisseria*-Gene *pilS* und *opa*, und ob die flankierenden Regionen des *orf*-Genbereichs an den Sequenzwiederholungen beteiligt sind, ist gegenwärtig nicht bekannt.

Beispiel 3

Charakterisierung der Lokalisierung von OrfA und OrfB an der Zelloberfläche

Um die aus der perfekten Strukturhomologie des Aminoterminus von *orfA* mit Lipoproteinsignalsequenzen ableitbare Lipoproteinnatur von OrfA experimentell zu beweisen, wurden sowohl *N. gonorrhoeae*, als auch mit dem *orf*-Genbereich transformierte *E. coli* Rekombinanten mit [³H]Palmitat markiert. Die Ergebnisse der Markierung zeigen, daß in allen Fällen, sowohl bei *N. gonorrhoeae*, als auch bei den *E. coli* Rekombinanten Lipoproteine im entsprechenden Molekulargewichtsbereich identifiziert wurden. Während bei *N. gonorrhoeae* mehrere Proteine markiert wurden und eine präzise Zuordnung der markierten Banden wegen der Nichtverfügbarkeit einer *orfA*⁻-Mutante nicht durchführbar war, zeigen die *orfA*-Rekombinanten von *E. coli* im Vergleich zum Kontrollstamm ganz eindeutig nur eine einzige zusätzlich Bande mit dem Molekulargewicht von OrfA. Ein zusätzlich getestetes OrfA-Fusionsprotein, das am Carboxyterminus durch eine Fusion um 3 kD vergrößert wurde, wies ebenfalls eine [³H]Palmitat-Markierung auf und migrierte an eine Position, die exakt dem erwarteten fusionsbedingt höheren Molekulargewicht entsprach.

Bei Behandlung präparierter Zellhüllen mit Detergentien zeigte OrfA eine Löslichkeit, wie sie für Proteine der äußeren Membran typisch ist. Durch Auftrennung der Zellhülle mittels Dichtegradienten-Zentrifugation konnte die Lokalisierung von OrfA in der äußeren Membran von *N. gonorrhoeae*

anhand von Leitproteinen bestätigt werden. Auch bei den orf-Rekombinanten von *E. coli* wurde OrfA mittels der genannten Technik als Proteinkomponente der äußeren Membran nachgewiesen.

Die Zugänglichkeit an der Zelloberfläche wurde mittels Immunfluoreszenz-Test sowohl für OrfA, als auch OrfB gezeigt. Eine pilC Defektmutante von *Neisseria gonorrhoeae*, deren beide pilC Gene ausgeschaltet sind, wird durch das PilC-OrfA Antiserum ebenso markiert, wie rekombinante *E. coli* Stämme, die den orf-Genbereich tragen. Der nichttransformierte Kontrollstamm verhielt sich, wie zu erwarten, negativ. Eine positive Reaktion im Immunfluoreszenztest von *N. gonorrhoeae* und orf-rekombinanten *E. coli* Stämmen ließ sich ebenfalls mit OrfA- und OrfB-spezifischen Antiseren erzeugen, wobei zur Herstellung dieser Antiseren gereinigte Fusionsproteine von entweder OrfA oder OrfB verwendet wurden. Wurde dagegen Antiserum verwendet, das gegen ein OrfI Fusionsprotein gerichtet war, so verlief der Immunfluoreszenztest mit *N. gonorrhoeae* negativ. Daraus läßt sich ableiten, daß OrfA und OrfB an der Zelloberfläche lokalisiert und von außen zugänglich sind, während für OrfI eine intrazelluläre Lokalisation wahrscheinlich ist.

Die Oberflächenlokalisierung von OrfA und OrfB ließ sich nur in rekombinanten *E. coli* Stämmen nachweisen, die den gesamten orf-Bereich trugen.

Beispiel 4

Adhäsion-Eigenschaft des OrfA-PilC Komplexes

Wie oben erwähnt ließ sich OrfA durch seine Affinität zu PilC über Chromatographie an einer Ni-NTA-Chelat-Matrix in reiner Form darstellen. Da für PilC die Funktion als pilusassoziiertes Adhäsion nachgewiesen und ebenfalls die direkte Bindung von PilC an humane ME-180 Zellen bekannt war,

lag es nahe, die Adhärenzeigenschaft des PilC-OrfA-Komplexes zu untersuchen. Die Experimente hierzu wurden mit dem E. coli Stamm HB101 (E141) durchgeführt, weil dieser keine Mannose-spezifischen TypI Pili besitzt und so gut wie keine Bindung an humane ME-180 und Chang Epithelzellen zeigt. Nach Transformation von HB101 mit dem Plasmid pES25, konnte weder eine Adhärenz an ME-180 noch an Chang-Zellen vermittelt werden. Wurden dieselben Rekombinanten jedoch mit gereinigtem PilC Protein vorinkubiert, so konnte eine starke Adhärenz an Chang Epithelzellen, nicht aber an ME-180 Zellen induziert werden (Tabelle I).

Tabelle I

OrfA-abhängige Modulation der PilC-vermittelten Adhäsinfunktion

	Adhärenz an humane Epithelzellen	
	ME180-Zellen	Chang-Zellen
N. gonorrhoeae, Orf+ PilC+, Pili+	+++	+
N. gonorrhoeae, Orf+, PilC+, Pili-	+	+++
E. coli (E141)	-	-
E. coli (E141) + PilC (extern)	-	-
E. coli (H2561)	-	-
E. coli (H2561) + PilC (extern)	-	-
E. coli (H2560)	-	+
E. coli (H2560) + PilC (extern)	-	+++

Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente ausgewertet, wobei die Adhärenz der Neisserien, von jeweils 500 Zellen abgeschätzt und die Adhärenz der E. coli-Stämme pro Epithelzelle gezählt wurde.

+++ 100 %, ++ 50 %, + 25 % Adhärenz.

E. coli E141 = E. coli Stamm HB101 ohne Plasmid; E. coli H2561 = E. coli Stamm HB101 mit Plasmid pBA; E. coli H2560 = E. coli Stamm HB101 mit Plasmid pES25

Das Plasmid pES25 (Figur 1) ist ein pBA-Vektor, der ein ca. 11 kb großes genomisches Fragment aus Neisseria gonorrhoeae

enthält, welches die codierenden Bereiche *orfA*, *orfB* und *orfI* trägt.

Der Stamm *E. coli* H2560 wurde bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig, Deutschland) unter der DSM-Hinterlegungsnummer DSM 10257 hinterlegt.

Das erhaltene Resultat ist überraschend, weil pilustragende Neisserien mit deutlich höherer Affinität an ME-180 Zellen binden, als an Chang Epithelzellen. Dieses Resultat läßt sich dahingehend interpretieren, daß PilC unterschiedliche Adhärenzeigenschaften aufweist, in Abhängigkeit von seiner Lokalisierung. Als Adhäsion-Komponente im Pilus bindet PilC bevorzugt an Rezeptoren der ME-180 Zelloberfläche, während im Komplex mit OrfA als oberflächenlokalisiertes Adhäsion PilC bevorzugt Rezeptoren auf Chang Epithelzellen erkennt. Ob dabei im letzteren Fall Adhäsionseigenschaften auch OrfA und/oder OrfB zuzuschreiben sind, ist gegenwärtig nicht bekannt.

Die für rekombinante *E. coli*-Stämme erzielten Befunde ließen sich mit identischem Resultat in *N. gonorrhoeae* reproduzieren. Wird der piluslose Stamm N 300 (P- Opa-), der kaum an ME-180 oder Chang Zellen bindet, mit gereinigtem PilC vorinkubiert, so kann hierdurch die Adhärenz an Chang Epithelzellen deutlich verstärkt werden.

Offensichtlich steht mit den beschriebenen experimentellen Ansätzen ein Modell zur Verfügung, das geeignet ist, einen Mechanismus für die Modulation der Adhärenzeigenschaften zu untersuchen, wie sie in kaskadenartiger Abfolge die zunehmend intensive Anheftung der Erreger an Wirtszellen bewirken bzw. dem Gewebetropismus zugrunde liegen können.

30
SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
- (B) STRASSE: keine
- (C) ORT: Berlin
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: keiner

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsäuremoleküle codierend Proteine, die die Adhäsion von Neisseria-Zellen an humane Zellen vermitteln

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19534579.7
- (B) ANMELDETAG: 18-SEP-1995

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3287 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Neisseria gonorrhoeae
- (B) STAMM: MS11

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: genomische Bibliothek in pBA
- (B) CLON(E): H1967/pES25

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 136..447

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:583..1542

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1585..3111

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGGCGCAAAC GGCGGACGCT GCTGTTAGCC CCGCTTGAAA CAAATGCCGT CTGAACGCCA	60
CTTCAGACGG CATTTTATA ATAAGGCGCT GTCCTAGATA ACTAGGGAAA TTCAAATTAA	120
GTTAGAATTA TCCCT ATG AGA AAA AGC CGT CTA AGC CGG TAT AAA CAA AAT	171
Met Arg Lys Ser Arg Leu Ser Arg Tyr Lys Gln Asn	
1 5 10	
AAA CTC ATT GAA CTG TTT GTC GCA GGC GTA ACT GCA AGA ACA GCA GCA	219
Lys Leu Ile Glu Leu Phe Val Ala Gly Val Thr Ala Arg Thr Ala Ala	
15 20 25	
GAG CCT GAC AGC ATT GTT TAT ACG GAT TGT TAT CGT CGC TAT GAT GTA	267
Glu Pro Asp Ser Ile Val Tyr Thr Asp Cys Tyr Arg Arg Tyr Asp Val	
30 35 40	
TTG GAT GCG GGC GAA TTT AGC CAT TTC CGT ATC AAT CAC AGC ACA CAT	315
Leu Asp Ala Gly Glu Phe Ser His Phe Arg Ile Asn His Ser Thr His	
45 50 55 60	
TTT GCC GAA CGA CAA AAC CAT ATT AAT GGA ATT GGG AAC TTT TGG AAC	363
Phe Ala Glu Arg Gln Asn His Ile Asn Gly Ile Gly Asn Phe Trp Asn	
65 70 75	
CGG GCA AAA CGT CAT TTA CGC AAG TTT GAC GGC ATT CCC AAA GAG CAT	411
Arg Ala Lys Arg His Leu Arg Lys Phe Asp Gly Ile Pro Lys Glu His	
80 85 90	
TTT GAG CCG TAT TTA AAG GAG TGC GAA CGG CGT TTT TAACAACAGT	457
Phe Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Cys Glu Arg Arg Phe	
95 100	
GAGATAAAAG TTCTTGTTCC ATTTTAAAC AATTAGTAAA ATCGAGTTTA TCCTAGTTGT	517
CCAGGACGGC CCCTAATTTA TTTACAATTT TGATACAATT TGTTTTTCAT CAAAGGAGAA	577
AATCT ATG CGG GCA CGG CTG CTG ATA CCT ATT CTT TTT TCG GTT TTT	624
Met Arg Ala Arg Leu Leu Ile Pro Ile Leu Phe Ser Val Phe	
1 5 10	
ATT TTA TCC GCC TGC GGG ACA CTG ACA GGT ATT CCA TCG CAT GGC GGA	672
Ile Leu Ser Ala Cys Gly Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser His Gly Gly	
15 20 25 30	

32

GGC AAA CGC TTC GCG GTC GAA CAA GAA CTT GTG GCC GCT TCT GCC AGA Gly Lys Arg Phe Ala Val Glu Gln Glu Leu Val Ala Ala Ser Ala Arg 35 40 45	720
GCT GCC GTT AAA GAC ATG GAT TTA CAG GCA TTA CAC GGA CGA AAA GTT Ala Ala Val Lys Asp Met Asp Leu Gln Ala Leu His Gly Arg Lys Val 50 55 60	768
GCA TTG TAC ATT GCA ACT ATG GGC GAC CAA GGT TCA GGC AGT TTG ACA Ala Leu Tyr Ile Ala Thr Met Gly Asp Gln Gly Ser Gly Ser Leu Thr 65 70 75	816
GGG GGT CGC TAC TCC ATT GAT GCA CTG ATT CGC GGC GAA TAC ATA AAC Gly Gly Arg Tyr Ser Ile Asp Ala Leu Ile Arg Gly Glu Tyr Ile Asn 80 85 90	864
AGC CCT GCC GTC CGC ACC GAT TAC ACC TAT CCG CGT TAC GAA ACC ACC Ser Pro Ala Val Arg Thr Asp Tyr Thr Tyr Pro Arg Tyr Glu Thr Thr 95 100 105 110	912
GCT GAA ACA ACA TCA GGC GGT TTG ACG GGT TTA ACC ACT TCT TTA TCT Ala Glu Thr Thr Ser Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ser Leu Ser 115 120 125	960
ACA CTT AAT GCC CCT GCA CTC TCG CGC ACC CAA TCA GAC GGT AGC GGA Thr Leu Asn Ala Pro Ala Leu Ser Arg Thr Gln Ser Asp Gly Ser Gly 130 135 140	1008
AGT AGG AGC AGT CTG GGC TTA AAT ATT GGC GGG ATG GGG GAT TAT CGA Ser Arg Ser Ser Leu Gly Leu Asn Ile Gly Gly Met Gly Asp Tyr Arg 145 150 155	1056
AAT GAA ACC TTG ACG ACC AAC CCG CGC GAC ACT GCC TTT CTT TCC CAC Asn Glu Thr Leu Thr Thr Asn Pro Arg Asp Thr Ala Phe Leu Ser His 160 165 170	1104
TTG GTA CAG ACC GTA TTT TTC CTG CGC GGC ATA GAC GTT GTT TCT CCT Leu Val Gln Thr Val Phe Phe Leu Arg Gly Ile Asp Val Val Ser Pro 175 180 185 190	1152
GCC AAT GCC GAT ACA GAT GTG TTT ATT AAC ATC GAC GTA TTC GGA ACG Ala Asn Ala Asp Thr Asp Val Phe Ile Asn Ile Asp Val Phe Gly Thr 195 200 205	1200
ATA CGC AAC AGA ACC GAA ATG CAC CTA TAC AAT GCC GAA ACA CTG AAA Ile Arg Asn Arg Thr Glu Met His Leu Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Lys 210 215 220	1248
GCC CAA ACA AAA CTG GAA TAT TTC GCA GTA GAC AGA ACC AAT AAA AAA Ala Gln Thr Lys Leu Glu Tyr Phe Ala Val Asp Arg Thr Asn Lys Lys 225 230 235	1296
TTG CTC ATC AAA CCC AAA ACC AAT GCG TTT GAA GCT GCC TAT AAA GAA Leu Leu Ile Lys Pro Lys Thr Asn Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Lys Glu 240 245 250	1344

33

AAT TAC GCA TTG TGG ATG GGG CCG TAT AAA GTA AGC AAA GGA ATC AAA Asn Tyr Ala Leu Trp Met Gly Pro Tyr Lys Val Ser Lys Gly Ile Lys 255 260 265 270	1392
CCG ACG GAA GGA TTA ATG GTC GAT TTC TCC GAT ATC CGG CCA TAC GGC Pro Thr Glu Gly Leu Met Val Asp Phe Ser Asp Ile Arg Pro Tyr Gly 275 280 285	1440
AAT CAT ACG GGT AAC TCC GCC CCA TCC GTA GAG GCT GAT AAC AGT CAT Asn His Thr Gly Asn Ser Ala Pro Ser Val Glu Ala Asp Asn Ser His 290 295 300	1488
GAG GGG TAT GGA TAC AGC GAT GAA GCA GTG CGA CAA CAT AGA CAA GGG Glu Gly Tyr Gly Tyr Ser Asp Glu Ala Val Arg Gln His Arg Gln Gly 305 310 315	1536
CAA CCT TGATTACAC TGCCATAACC GCTTGCTGCC AAGGAAAACA AA ATG AAT Gln Pro Met Asn 320 1	1590
TTG CCT ATT CAA AAA TTC ATG ATG CTG TTT GCA GCG GCA ATA TCG TTG Leu Pro Ile Gln Lys Phe Met Met Leu Phe Ala Ala Ala Ile Ser Leu 5 10 15	1638
CTG CAA ATC CCC ATT AGT CAT GCG AAC GGT TTG GAT GCC CGT TTG CGC Leu Gln Ile Pro Ile Ser His Ala Asn Gly Leu Asp Ala Arg Leu Arg 20 25 30	1686
GAT GAT ATG CAG GCA AAA CAC TAC GAA CCG GGT GGC AAA TAC CAT CTG Asp Asp Met Gln Ala Lys His Tyr Glu Pro Gly Gly Lys Tyr His Leu 35 40 45 50	1734
TTC GGT AAT GCT CGC GGC AGT GTT AAA AAT CGG GTT TGC GCC GTC CAA Phe Gly Asn Ala Arg Gly Ser Val Lys Asn Arg Val Cys Ala Val Gln 55 60 65	1782
ACA TTT GAT GCA ACT GCG GTC GGC CCC ATA CTG CCT ATT ACA CAC GAA Thr Phe Asp Ala Thr Ala Val Gly Pro Ile Leu Pro Ile Thr His Glu 70 75 80	1830
CGG ACA GGG TTT GAA GGC ATT ATC GGT TAT GAA ACC CAT TTT TCA GGA Arg Thr Gly Phe Glu Gly Ile Ile Gly Tyr Glu Thr His Phe Ser Gly 85 90 95	1878
CAC GGA CAC GAA GTA CAC AGT CCG TTC GAT AAT CAT GAT TCA AAA AGC His Gly His Glu Val His Ser Pro Phe Asp Asn His Asp Ser Lys Ser 100 105 110	1926
ACT TCT GAT TTC AGC GGC GGC GTA GAC GGC GGT TTT ACC GTT TAC CAA Thr Ser Asp Phe Ser Gly Gly Val Asp Gly Gly Phe Thr Val Tyr Gln 115 120 125 130	1974
CTT CAT CGG ACA GGG TCG GAA ATA CAT CCC GCA GAC GGA TAT GAC GGG Leu His Arg Thr Gly Ser Glu Ile His Pro Ala Asp Gly Tyr Asp Gly 135 140 145	2022

34

CCT CAA GGC GGC GGT TAT CCG GAA CCA CAA GGG GCA AGG GAT ATA TAC Pro Gln Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Gln Gly Ala Arg Asp Ile Tyr 150 155 160	2070
AGC TAC CAT ATC AAA GGA ACT TCA ACC AAA ACA AAG ATA AAC ACT GTT Ser Tyr His Ile Lys Gly Thr Ser Thr Lys Thr Lys Ile Asn Thr Val 165 170 175	2118
CCG CAA GCC CCT TTT TCA GAC CGC TGG CTA AAA GAA AAT GCC GGT GCC Pro Gln Ala Pro Phe Ser Asp Arg Trp Leu Lys Glu Asn Ala Gly Ala 180 185 190	2166
GCT TCC GGT TTT CTC AGC CGT GCG GAT GAA GCA GGA AAA CTG ATA TGG Ala Ser Gly Phe Leu Ser Arg Ala Asp Glu Ala Gly Lys Leu Ile Trp 195 200 205 210	2214
GAA AAC GAC CCC GAT AAA AAT TGG CGG GCT AAC CGT ATG GAT GAT ATT Glu Asn Asp Pro Asp Lys Asn Trp Arg Ala Asn Arg Met Asp Asp Ile 215 220 225	2262
CGC GGC ATC GTC CAA GGT GCG GTT AAT CCT TTT TTA ACG GGT TTT CAG Arg Gly Ile Val Gln Gly Ala Val Asn Pro Phe Leu Thr Gly Phe Gln 230 235 240	2310
GGA TTG GGA GTT GGG GCA ATT ACA GAC AGT GCG GTA AGC CCG GTA ACC Gly Leu Gly Val Gly Ala Ile Thr Asp Ser Ala Val Ser Pro Val Thr 245 250 255	2358
TAT GCG GCA GCA CGG AAA ACT TTA CAG GGT ATT CAC AAT TTA GGA AAT Tyr Ala Ala Ala Arg Lys Thr Leu Gln Gly Ile His Asn Leu Gly Asn 260 265 270	2406
TTA AGT CCG GAA GCA CAA CTT GCC GCC GCG AGC CTA TTA CAG GAC AGT Leu Ser Pro Glu Ala Gln Leu Ala Ala Ala Ser Leu Leu Gln Asp Ser 275 280 285 290	2454
GCC TTT GCG GTA AAA GAC GGC ATC AAT TCC GCC AGA CAA TGG GCT GAT Ala Phe Ala Val Lys Asp Gly Ile Asn Ser Ala Arg Gln Trp Ala Asp 295 300 305	2502
GCC CAT CCG AAT ATA ACA GCA ACA GCC CAA ACT GCC CTT GCC GTA GCA Ala His Pro Asn Ile Thr Ala Thr Ala Gln Thr Ala Leu Ala Val Ala 310 315 320	2550
GAG GCT GCA GGT ACG GTT TGG GGA GGT AAA AAA GTA GAA CTT AAC CCG Glu Ala Ala Gly Thr Val Trp Gly Gly Lys Lys Val Glu Leu Asn Pro 325 330 335	2598
ACC AAA TGG GAT TGG GTT AAA AAT ACC GGC TAT GAA AAA CCT GCT GCC Thr Lys Trp Asp Trp Val Lys Asn Thr Gly Tyr Glu Lys Pro Ala Ala 340 345 350	2646
CGA CCT ATG CAG ACT GTA GAC GGG GAA ATG GCC GGG AAA AAT AAG CCA Arg Pro Met Gln Thr Val Asp Gly Glu Met Ala Gly Lys Asn Lys Pro 355 360 365 370	2694

35

CCG AAA CCA AGT ACG CAG CAA CAC TCT ACA CAC TCT GAT AAC AAT ATC	2742
Pro Lys Pro Ser Thr Gln Gln His Ser Thr His Ser Asp Asn Asn Ile	
375 380 385	
GGC TTA CCT GCC CCA TAT GTT AAA CCT GAT ACA TCT ATT TCT CCG ACA	2790
Gly Leu Pro Ala Pro Tyr Val Lys Pro Asp Thr Ser Ile Ser Pro Thr	
390 395 400	
GGA ACA ATT CAA GAC CGC ATC AGA TGG ACA AAA TCC AAG TTT CCT ACT	2838
Gly Thr Ile Gln Asp Arg Ile Arg Trp Thr Lys Ser Lys Phe Pro Thr	
405 410 415	
GAG AAA TCT TTA AAT GGA CAT TTC AAA GCT CAT GGA AAA GAA TTT GGC	2886
Glu Lys Ser Leu Asn Gly His Phe Lys Ala His Gly Lys Glu Phe Gly	
420 425 430	
GAT ATA ACC ATT GAA GAC TAC CAA AAA ATG GCG TCT GAT TTG TTA TCA	2934
Asp Ile Thr Ile Glu Asp Tyr Gln Lys Met Ala Ser Asp Leu Leu Ser	
435 440 445 450	
AAA CAG ACA TCG GAC AAG ATA TTA GGT TAT CAG ACG GAA CAT AGA CGA	2982
Lys Gln Thr Ser Asp Lys Ile Leu Gly Tyr Gln Thr Glu His Arg Arg	
455 460 465	
GTG CGC TAT GAT ATC AAT AAC AAT ATC TAT GTT TTG GCC AAT CCA AAA	3030
Val Arg Tyr Asp Ile Asn Asn Asn Ile Tyr Val Leu Ala Asn Pro Lys	
470 475 480	
ACA TTC AAA ATC AAA ACA ATG TTT AAA CCA AAC TTA GGA AAG GAG TAT	3078
Thr Phe Lys Ile Lys Thr Met Phe Lys Pro Asn Leu Gly Lys Glu Tyr	
485 490 495	
TAT GAT GGA GAA TTC AAA AAA GAC ATG GGA AAT TGACGGAGAA ATATGGCTAC	3131
Tyr Asp Gly Glu Phe Lys Lys Asp Met Gly Asn	
500 505	
ATTGTCCTGT TTGCGGA ACT GAAGTTATGG ACTATGATAT CTGTGACGTT TGTCAGTGGC	3191
AAAATACAGG AGAACTAAT ATAGATGGTG GTCCTAATGA AATGACACTT GCGGAGGCCA	3251
AAGAAGCTTA CGCAAAAGGC TTACCAATCA GATAAA	3287

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1136 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

36

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Neisseria gonorrhoeae

(B) STAMM: MS11

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:135..1094

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AACAACAGTG AGATAAAAGT TCTTGTTCCA TTTTAAAACA ATTAGTAAAA TCGAGTTTAT	60
CCTAGTTGTC CAGGACGGCC CCTAATTTAT TTACAATTTT GATACAATTT GTTTTTCATC	120
AAAGGAGAAA ATCT ATG CGG GCA CGG CTG CTG ATA CCT ATT CTT TTT TCG	170
Met Arg Ala Arg Leu Leu Ile Pro Ile Leu Phe Ser	
510 515 520	
GTT TTT ATT TTA TCC GCC TGC GGG ACA CTG ACA GGT ATT CCA TCG CAT	218
Val Phe Ile Leu Ser Ala Cys Gly Thr Leu Thr Gly Ile Pro Ser His	
525 530 535	
GGC GGA GGC AAA CGC TTC GCG GTC GAA CAA GAA CTT GTG GCC GCT TCT	266
Gly Gly Gly Lys Arg Phe Ala Val Glu Gln Glu Leu Val Ala Ala Ser	
540 545 550	
GCC AGA GCT GCC GTT AAA GAC ATG GAT TTA CAG GCA TTA CAC GGA CGA	314
Ala Arg Ala Ala Val Lys Asp Met Asp Leu Gln Ala Leu His Gly Arg	
555 560 565	
AAA GTT GCA TTG TAC ATT GCA ACT ATG GGC GAC CAA GGT TCA GGC AGT	362
Lys Val Ala Leu Tyr Ile Ala Thr Met Gly Asp Gln Gly Ser Gly Ser	
570 575 580 585	
TTG ACA GGG GGT CGC TAC TCC ATT GAT GCA CTG ATT CGC GGC GAA TAC	410
Leu Thr Gly Gly Arg Tyr Ser Ile Asp Ala Leu Ile Arg Gly Glu Tyr	
590 595 600	
ATA AAC AGC CCT GCC GTC CGC ACC GAT TAC ACC TAT CCG CGT TAC GAA	458
Ile Asn Ser Pro Ala Val Arg Thr Asp Tyr Thr Tyr Pro Arg Tyr Glu	
605 610 615	
ACC ACC GCT GAA ACA ACA TCA GGC GGT TTG ACG GGT TTA ACC ACT TCT	506
Thr Thr Ala Glu Thr Thr Ser Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ser	
620 625 630	
TTA TCT ACA CTT AAT GCC CCT GCA CTC TCG CGC ACC CAA TCA GAC GGT	554
Leu Ser Thr Leu Asn Ala Pro Ala Leu Ser Arg Thr Gln Ser Asp Gly	
635 640 645	
AGC GGA AGT AGG AGC AGT CTG GGC TTA AAT ATT GGC GGG ATG GGG GAT	602
Ser Gly Ser Arg Ser Ser Leu Gly Leu Asn Ile Gly Gly Met Gly Asp	
650 655 660 665	

37

TAT CGA AAT GAA ACC TTG ACG ACC AAC CCG CGC GAC ACT GCC TTT CTT	650
Tyr Arg Asn Glu Thr Leu Thr Thr Asn Pro Arg Asp Thr Ala Phe Leu	
670 675 680	
TCC CAC TTG GTA CAG ACC GTA TTT TTC CTG CGC GGC ATA GAC GTT GTT	698
Ser His Leu Val Gln Thr Val Phe Leu Arg Gly Ile Asp Val Val	
685 690 695	
TCT CCT GCC AAT GCC GAT ACA GAT GTG TTT ATT AAC ATC GAC GTA TTC	746
Ser Pro Ala Asn Ala Asp Thr Asp Val Phe Ile Asn Ile Asp Val Phe	
700 705 710	
GGA ACG ATA CGC AAC AGA ACC GAA ATG CAC CTA TAC AAT GCC GAA ACA	794
Gly Thr Ile Arg Asn Arg Thr Glu Met His Leu Tyr Asn Ala Glu Thr	
715 720 725	
CTG AAA GCC CAA ACA AAA CTG GAA TAT TTC GCA GTA GAC AGA ACC AAT	842
Leu Lys Ala Gln Thr Lys Leu Glu Tyr Phe Ala Val Asp Arg Thr Asn	
730 735 740 745	
AAA AAA TTG CTC ATC AAA CCC AAA ACC AAT GCG TTT GAA GCT GCC TAT	890
Lys Lys Leu Leu Ile Lys Pro Lys Thr Asn Ala Phe Glu Ala Ala Tyr	
750 755 760	
AAA GAA AAT TAC GCA TTG TGG ATG GGG CCG TAT AAA GTA AGC AAA GGA	938
Lys Glu Asn Tyr Ala Leu Trp Met Gly Pro Tyr Lys Val Ser Lys Gly	
765 770 775	
ATC AAA CCG ACG GAA GGA TTA ATG GTC GAT TTC TCC GAT ATC CGG CCA	986
Ile Lys Pro Thr Glu Gly Leu Met Val Asp Phe Ser Asp Ile Arg Pro	
780 785 790	
TAC GGC AAT CAT ACG GGT AAC TCC GCC CCA TCC GTA GAG GCT GAT AAC	1034
Tyr Gly Asn His Thr Gly Asn Ser Ala Pro Ser Val Glu Ala Asp Asn	
795 800 805	
AGT CAT GAG GGG TAT GGA TAC AGC GAT GAA GCA GTG CGA CAA CAT AGA	1082
Ser His Glu Gly Tyr Gly Tyr Ser Asp Glu Ala Val Arg Gln His Arg	
810 815 820 825	
CAA GGG CAA CCT TGATTCACAC TGCCATAACC GCTTGCTGCC AAGGAAAACA	1134
Gln Gly Gln Pro	
AA	1136

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 582 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

38

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Neisseria gonorrhoeae
 (B) STAMM: MS11
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:136..447

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGGCGCAAAC GCGCGACGCT GCTGTTAGCC CCGCTTGAAA CAAATGCCGT CTGAACGCCA	60
CTTCAGACGG CATTTTTATA ATAAGGCGCT GTCCTAGATA ACTAGGGAAA TTCAAATTAA	120
GTTAGAATTA TCCCT ATG AGA AAA AGC CGT CTA AGC CGG TAT AAA CAA AAT	171
Met Arg Lys Ser Arg Leu Ser Arg Tyr Lys Gln Asn	
325 330	
AAA CTC ATT GAA CTG TTT GTC GCA GGC GTA ACT GCA AGA ACA GCA GCA	219
Lys Leu Ile Glu Leu Phe Val Ala Gly Val Thr Ala Arg Thr Ala Ala	
335 340 345	
GAG CCT GAC AGC ATT GTT TAT ACG GAT TGT TAT CGT CGC TAT GAT GTA	267
Glu Pro Asp Ser Ile Val Tyr Thr Asp Cys Tyr Arg Arg Tyr Asp Val	
350 355 360	
TTG GAT GCG GGC GAA TTT AGC CAT TTC CGT ATC AAT CAC AGC ACA CAT	315
Leu Asp Ala Gly Glu Phe Ser His Phe Arg Ile Asn His Ser Thr His	
365 370 375 380	
TTT GCC GAA CGA CAA AAC CAT ATT AAT GGA ATT GGG AAC TTT TGG AAC	363
Phe Ala Glu Arg Gln Asn His Ile Asn Gly Ile Gly Asn Phe Trp Asn	
385 390 395	
CGG GCA AAA CGT CAT TTA CGC AAG TTT GAC GGC ATT CCC AAA GAG CAT	411
Arg Ala Lys Arg His Leu Arg Lys Phe Asp Gly Ile Pro Lys Glu His	
400 405 410	
TTT GAG CCG TAT TTA AAG GAG TGC GAA CGG CGT TTT TAACAACAGT	457
Phe Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Cys Glu Arg Arg Phe	
415 420	
GAGATAAAAG TTCTGTTC ATTTTAAAC AATTAGTAAA ATCGAGTTTA TCCTAGTTGT	517
CCAGGACGGC CCCTAATTA TTTACAATTT TGATACAATT TGTTTTTCAT CAAAGGAGAA	577
AATCT	582

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1744 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Neisseria gonorrhoeae
- (B) STAMM: MS11

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 42..1568

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GATTCACACT GCCATAACCG CTTGCTGCCA AGGAAAACAA A ATG AAT TTG CCT	53
Met Asn Leu Pro	
105	
ATT CAA AAA TTC ATG ATG CTG TTT GCA GCG GCA ATA TCG TTG CTG CAA	101
Ile Gln Lys Phe Met Met Leu Phe Ala Ala Ala Ile Ser Leu Leu Gln	
110 115 120	
ATC CCC ATT AGT CAT GCG AAC GGT TTG GAT GCC CGT TTG CGC GAT GAT	149
Ile Pro Ile Ser His Ala Asn Gly Leu Asp Ala Arg Leu Arg Asp Asp	
125 130 135 140	
ATG CAG GCA AAA CAC TAC GAA CCG GGT GGC AAA TAC CAT CTG TTC GGT	197
Met Gln Ala Lys His Tyr Glu Pro Gly Gly Lys Tyr His Leu Phe Gly	
145 150 155	
AAT GCT CGC GGC AGT GTT AAA AAT CGG GTT TGC GCC GTC CAA ACA TTT	245
Asn Ala Arg Gly Ser Val Lys Asn Arg Val Cys Ala Val Gln Thr Phe	
160 165 170	
GAT GCA ACT GCG GTC GGC CCC ATA CTG CCT ATT ACA CAC GAA CGG ACA	293
Asp Ala Thr Ala Val Gly Pro Ile Leu Pro Ile Thr His Glu Arg Thr	
175 180 185	
GGG TTT GAA GGC ATT ATC GGT TAT GAA ACC CAT TTT TCA GGA CAC GGA	341
Gly Phe Glu Gly Ile Ile Gly Tyr Glu Thr His Phe Ser Gly His Gly	
190 195 200	
CAC GAA GTA CAC AGT CCG TTC GAT AAT CAT GAT TCA AAA AGC ACT TCT	389
His Glu Val His Ser Pro Phe Asp Asn His Asp Ser Lys Ser Thr Ser	
205 210 215 220	

40

GAT TTC AGC GGC GGC GTA GAC GGC GGT TTT ACC GTT TAC CAA CTT CAT Asp Phe Ser Gly Gly Val Asp Gly Gly Phe Thr Val Tyr Gln Leu His 225 230 235	437
CGG ACA GGG TCG GAA ATA CAT CCC GCA GAC GGA TAT GAC GGG CCT CAA Arg Thr Gly Ser Glu Ile His Pro Ala Asp Gly Tyr Asp Gly Pro Gln 240 245 250	485
GGC GGC GGT TAT CCG GAA CCA CAA GGG GCA AGG GAT ATA TAC AGC TAC Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Gln Gly Ala Arg Asp Ile Tyr Ser Tyr 255 260 265	533
CAT ATC AAA GGA ACT TCA ACC AAA ACA AAG ATA AAC ACT GTT CCG CAA His Ile Lys Gly Thr Ser Thr Lys Thr Lys Ile Asn Thr Val Pro Gln 270 275 280	581
GCC CCT TTT TCA GAC CGC TGG CTA AAA GAA AAT GCC GGT GCC GCT TCC Ala Pro Phe Ser Asp Arg Trp Leu Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala Ser 285 290 295 300	629
GGT TTT CTC AGC CGT GCG GAT GAA GCA GGA AAA CTG ATA TGG GAA AAC Gly Phe Leu Ser Arg Ala Asp Glu Ala Gly Lys Leu Ile Trp Glu Asn 305 310 315	677
GAC CCC GAT AAA AAT TGG CGG GCT AAC CGT ATG GAT GAT ATT CGC GGC Asp Pro Asp Lys Asn Trp Arg Ala Asn Arg Met Asp Asp Ile Arg Gly 320 325 330	725
ATC GTC CAA GGT GCG GTT AAT CCT TTT TTA ACG GGT TTT CAG GGA TTG Ile Val Gln Gly Ala Val Asn Pro Phe Leu Thr Gly Phe Gln Gly Leu 335 340 345	773
GGA GTT GGG GCA ATT ACA GAC AGT GCG GTA AGC CCG GTA ACC TAT GCG Gly Val Gly Ala Ile Thr Asp Ser Ala Val Ser Pro Val Thr Tyr Ala 350 355 360	821
GCA GCA CGG AAA ACT TTA CAG GGT ATT CAC AAT TTA GGA AAT TTA AGT Ala Ala Arg Lys Thr Leu Gln Gly Ile His Asn Leu Gly Asn Leu Ser 365 370 375 380	869
CCG GAA GCA CAA CTT GCC GCC GCG AGC CTA TTA CAG GAC AGT GCC TTT Pro Glu Ala Gln Leu Ala Ala Ala Ser Leu Leu Gln Asp Ser Ala Phe 385 390 395	917
GCG GTA AAA GAC GGC ATC AAT TCC GCC AGA CAA TGG GCT GAT GCC CAT Ala Val Lys Asp Gly Ile Asn Ser Ala Arg Gln Trp Ala Asp Ala His 400 405 410	965
CCG AAT ATA ACA GCA ACA GCC CAA ACT GCC CTT GCC GTA GCA GAG GCT Pro Asn Ile Thr Ala Thr Ala Gln Thr Ala Leu Ala Val Ala Glu Ala 415 420 425	1013
GCA GGT ACG GTT TGG GGA GGT AAA AAA GTA GAA CTT AAC CCG ACC AAA Ala Gly Thr Val Trp Gly Gly Lys Lys Val Glu Leu Asn Pro Thr Lys 430 435 440	1061

41

TGG GAT TGG GTT AAA AAT ACC GGC TAT GAA AAA CCT GCT GCC CGA CCT	1109
Trp Asp Trp Val Lys Asn Thr Gly Tyr Glu Lys Pro Ala Ala Arg Pro	
445 450 455 460	
ATG CAG ACT GTA GAC GGG GAA ATG GCC GGG AAA AAT AAG CCA CCG AAA	1157
Met Gln Thr Val Asp Gly Glu Met Ala Gly Lys Asn Lys Pro Pro Lys	
465 470 475	
CCA AGT ACG CAG CAA CAC TCT ACA CAC TCT GAT AAC AAT ATC GGC TTA	1205
Pro Ser Thr Gln Gln His Ser Thr His Ser Asp Asn Asn Ile Gly Leu	
480 485 490	
CCT GCC CCA TAT GTT AAA CCT GAT ACA TCT ATT TCT CCG ACA GGA ACA	1253
Pro Ala Pro Tyr Val Lys Pro Asp Thr Ser Ile Ser Pro Thr Gly Thr	
495 500 505	
ATT CAA GAC CGC ATC AGA TGG ACA AAA TCC AAG TTT CCT ACT GAG AAA	1301
Ile Gln Asp Arg Ile Arg Trp Thr Lys Ser Lys Phe Pro Thr Glu Lys	
510 515 520	
TCT TTA AAT GGA CAT TTC AAA GCT CAT GGA AAA GAA TTT GGC GAT ATA	1349
Ser Leu Asn Gly His Phe Lys Ala His Gly Lys Glu Phe Gly Asp Ile	
525 530 535 540	
ACC ATT GAA GAC TAC CAA AAA ATG GCG TCT GAT TTG TTA TCA AAA CAG	1397
Thr Ile Glu Asp Tyr Gln Lys Met Ala Ser Asp Leu Leu Ser Lys Gln	
545 550 555	
ACA TCG GAC AAG ATA TTA GGT TAT CAG ACG GAA CAT AGA CGA GTG CGC	1445
Thr Ser Asp Lys Ile Leu Gly Tyr Gln Thr Glu His Arg Arg Val Arg	
560 565 570	
TAT GAT ATC AAT AAC AAT ATC TAT GTT TTG GCC AAT CCA AAA ACA TTC	1493
Tyr Asp Ile Asn Asn Asn Ile Tyr Val Leu Ala Asn Pro Lys Thr Phe	
575 580 585	
AAA ATC AAA ACA ATG TTT AAA CCA AAC TTA GGA AAG GAG TAT TAT GAT	1541
Lys Ile Lys Thr Met Phe Lys Pro Asn Leu Gly Lys Glu Tyr Tyr Asp	
590 595 600	
GGA GAA TTC AAA AAA GAC ATG GGA AAT TGACGGAGAA ATATGGCTAC	1588
Gly Glu Phe Lys Lys Asp Met Gly Asn	
605 610	
ATTGTCCTGT TTGCGGAACT GAAGTTATGG ACTATGATAT CTGTGACGTT TGTCAGTGCC	1648
AAAATACAGG AGAAACTAAT ATAGATGGTG GTCCTAATGA AATGACACTT GCGGAGGCGA	1708
AAGAAGCTTA CGCAAAAGGC TTACCAATCA GATAAA	1744

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS

(Regel 13^{bis} PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>29</u> Zeile <u>3-5</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG <div style="float: right; text-align: right;"> Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/> </div>	
Name der Hinterlegungsstelle <div style="text-align: center;">DSM Deutsche Sammlung für Mikroorganismen</div>	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Datum der Hinterlegung <div style="text-align: center;">18.09.1995</div>	Eingangsnummer <div style="text-align: center;">DSM 10257</div>
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) <div style="float: right; text-align: right;"> Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/> </div>	
Die Anmelder nehmen Regel 28(4) EPÜ in Anspruch.	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
EP	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen. z. B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	

Nur zur Verwendung im Anmeldeamt	
<input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung	
Bevollmächtigter Bediensteter <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> O. Gorge </div>	

Nur zur Verwendung im Internationalen Büro	
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:	
Bevollmächtigter Bediensteter	

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nucleinsäure-Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) Nucleinsäure-Molekülen, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz aufweisen;
 - (b) Nucleinsäure-Molekülen, wie in (a) definiert, bei denen jedoch die Nucleotidsequenzen der offenen Leserahmen von den in Seq ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenzen aufgrund der Degeneration des genetischen Codes abweichen; und
 - (c) Nucleinsäure-Molekülen, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleinsäure-Molekülen hybridisieren, wobei die in dem Nucleinsäure-Molekül enthaltenen offenen Leserahmen Proteine oder biologisch aktive Fragmente davon aus Bakterien der Gattung *Neisseria* codieren, die die Adhäsion von *Neisseria*-Zellen an humane Zellen vermitteln.
2. Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 1, wobei das Molekül aus einer pathogenen *Neisseria* Spezies stammt.
3. Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 2, wobei die *Neisseria* Spezies *Neisseria gonorrhoeae* oder *Neisseria meningitidis* ist.
4. Vektor enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 4 enthält oder mit einem Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 genetisch manipuliert ist.
6. Fragment eines Nucleinsäure-Moleküls nach Anspruch 1, codierend ein Lipoprotein oder biologisch aktive Fragmente davon aus Bakterien der Gattung *Neisseria* ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) Nucleinsäure-Molekülen, die für ein Protein mit der in Seq ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz codieren;
 - (b) Nucleinsäure-Molekülen, die für ein Protein mit der in Seq ID No. 2 dargestellten Aminosäuresequenz von Aminosäurerest 19 bis Aminosäurerest 320 codieren;
 - (c) Nucleinsäure-Molekülen, mit der unter Seq ID No. 2 dargestellten Nucleotidsequenz;
 - (d) Nucleinsäure-Molekülen mit der Sequenz von Nucleotid 189 bis Nucleotid 1095 der in Seq ID No. 2 dargestellten Nucleotidsequenz;
 - (e) Nucleinsäure-Molekülen, deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b), (c) oder (d) genannten Moleküle abweicht; und
 - (f) Nucleinsäure-Molekülen, die mit den in (a), (b), (c), (d) oder (e) genannten Molekülen hybridisieren.
7. Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 6, wobei das Lipoprotein oder biologisch aktive Fragment davon die Fähigkeit zur Adhärenz an humane Zellen aufweist.
8. Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 7, wobei das Protein oder biologisch aktive Fragment in Komplexen mit dem Protein PilC die Fähigkeit zur Adhärenz an humane Zellen besitzt.
9. Vektor enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8.
10. Vektor nach Anspruch 9, wobei das Nucleinsäure-Molekül mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Expression in pro- oder eukaryontischen Zellen erlauben.
11. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 9 oder 10 enthält oder mit einem Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8 genetisch manipuliert ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Lipoproteins oder biologisch aktiver Fragmente davon, bei dem Wirtszellen nach Anspruch 11 unter Bedingungen kultiviert werden, die die Expression des Proteins erlauben, den Zellen und/oder dem Kulturüberstand isoliert wird.
13. Protein, das von einem Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8 codiert wird oder biologisch aktive Fragmente davon.
14. Protein, das eine Aminosäuresequenz enthält, die mit der Aminosäuresequenz eines Proteins nach Anspruch 13 oder eines Teils davon immunologisch kreuzreagiert.
15. Verfahren zur Isolierung eines Proteins nach Anspruch 13, wobei die Reinigung des Proteins aus Homogenaten von Zellen, die das Protein exprimieren, unter der Ausnutzung der Affinität des Proteins an PilC erfolgt.
16. Antikörper gegen ein Protein oder Fragmente davon nach Anspruch 13 oder 14.
17. Antikörper nach Anspruch 16, wobei dieser gegen die die Adhärenz an humane Zellen vermittelnde Aminosäuresequenz des Proteins gerichtet ist.
18. Nucleinsäure-Molekül von mindestens 12 Nucleotiden Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 hybridisiert.
19. Arzneimittel enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8, ein Protein oder biologisch aktives Fragment davon nach Anspruch 13 oder 14, ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 18 und/oder einen Antikörper nach Anspruch 16 oder 17 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

20. Diagnostische Zusammensetzung enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8, ein Protein oder Fragmente davon nach Anspruch 13 oder 14, ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 18 und/oder einen Antikörper nach Anspruch 16 oder 17.
21. Impfstoff, enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8, ein Protein oder biologisch aktive Fragmente davon nach Anspruch 13 oder 14 und/oder einen Antikörper nach Anspruch 16 oder 17.
22. Zelluläre Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß sie an ein Protein nach Anspruch 13 oder 14 binden und die Adhärenzfunktion hemmen.
23. Rezeptoranaloge Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß sie als kompetitive Hemmstoffe die Adhärenzfunktion von Proteinen nach Anspruch 13 oder 14 beeinflussen.
24. Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Interaktion zwischen Proteinen nach Anspruch 13 oder 14 und zellulären Rezeptoren hemmen.
25. Arzneimittel enthaltend zelluläre Rezeptoren, rezeptoranaloge Substanzen oder Inhibitoren nach Anspruch 22, 23 oder 24.
26. Fragment eines Nucleinsäure-Moleküls nach Anspruch 1, codierend ein Protein oder biologisch aktive Fragmente davon aus Bakterien der Gattung Neisseria, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) Nucleinsäure-Molekülen, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 3 dargestellten Aminosäuresequenz codieren;
 - (b) Nucleinsäure-Molekülen, die die unter Seq ID No. 3 dargestellte Nucleotidsequenz aufweisen;

- (c) Nucleinsäure-Molekülen, deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a) oder (b) genannten Moleküle abweicht; und
 - (d) Nucleinsäure-Molekülen, die mit den in (a), (b) oder (c) genannten Molekülen hybridisieren.
27. Vektor enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 26.
28. Vektor nach Anspruch 27, wobei das Nucleinsäure-Molekül mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Expression in pro- oder eukaryontischen Zellen erlauben.
29. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 27 oder 28 enthält oder die mit einem Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 26 genetisch manipuliert ist.
30. Protein, das von einem Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 26 codiert wird oder biologisch aktive Fragmente davon.
31. Protein, das eine Aminosäuresequenz enthält, die mit einer Aminosäuresequenz eines Proteins nach Anspruch 30 oder Teilen davon immunologisch kreuzreagiert.
32. Verfahren zur Herstellung des Proteins oder biologisch aktiver Fragmente davon nach Anspruch 30 oder 31, bei dem Wirtszellen nach Anspruch 29 unter Bedingungen kultiviert werden, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturüberstand isoliert wird.
33. Antikörper gegen ein Protein oder Fragmente davon nach Anspruch 30 oder 31.

34. Nucleinsäure-Molekül von mindestens 12 Nucleotiden Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 26 hybridisiert.
35. Arzneimittel enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 26, ein Protein oder biologisch aktives Fragment davon nach Anspruch 30 oder 31, ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 34 und/oder Antikörper nach Anspruch 33 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
36. Diagnostische Zusammensetzung enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 26, ein Protein oder biologisch aktive Fragmente davon nach Anspruch 30 oder 31, ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 34 und/oder einen Antikörper nach Anspruch 33.
37. Fragment eines Nucleinsäure-Moleküls nach Anspruch 1, codierend ein Protein oder biologisch aktive Fragmente davon aus Bakterien der Gattung Neisseria, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- (a) Nucleinsäure-Molekülen, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 4 dargestellten Aminosäuresequenz codieren,
 - (b) Nucleinsäure-Molekülen, die die unter Seq ID No. 4 dargestellte Nucleotidsequenz aufweisen;
 - (c) Nucleinsäure-Molekülen, deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a) oder (b) genannten Moleküle abweicht; und
 - (d) Nucleinsäure-Molekülen, die mit den in (a), (b) oder (c) genannten Molekülen hybridisieren.
38. Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37, wobei das Protein oder biologisch aktive Fragment in Komplexen mit dem Protein PilC die Fähigkeit zur Adhärenz an humane Zellen besitzt.

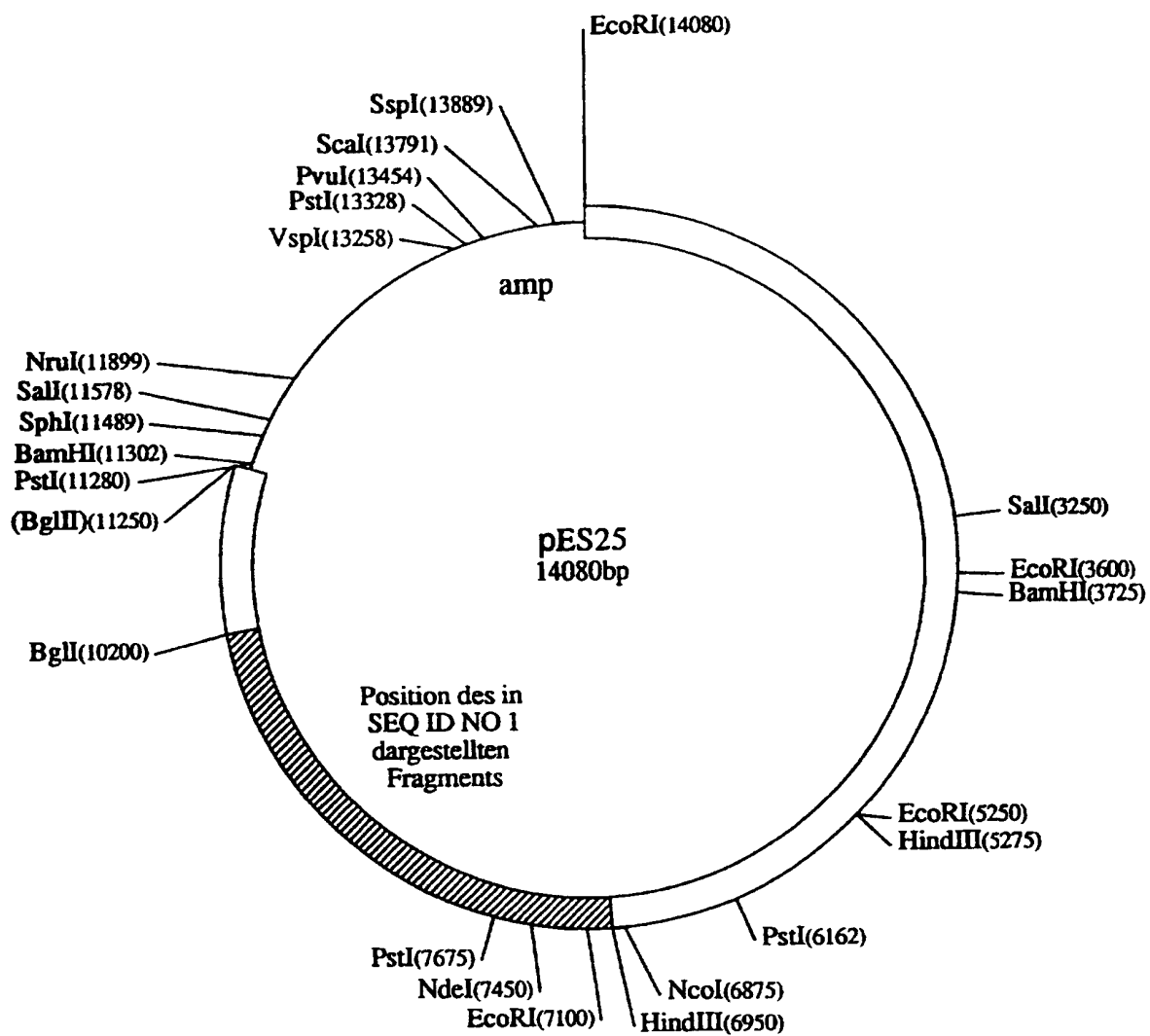
39. Vektor enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37 oder 38.
40. Vektor nach Anspruch 39, wobei das Nucleinsäure-Molekül mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Expression in pro- oder eukaryontischen Zellen erlauben.
41. Wirtszelle, die einen Vektor nach Anspruch 38 oder 40 enthält oder die genetisch manipuliert ist mit einem Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37 oder 38.
42. Protein, das von einem Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37 oder 38 codiert wird oder biologisch aktive Fragmente davon.
43. Protein, das eine Aminosäuresequenz enthält, die mit einer Aminosäuresequenz eines Proteins nach Anspruch 42 oder Teilen davon immunologisch kreuzreagiert.
44. Verfahren zur Herstellung des Proteins oder biologisch aktiver Fragmente davon nach Anspruch 42 oder 43, bei dem Wirtszellen nach Anspruch 41 unter Bedingungen kultiviert werden, die die Expression des Proteins erlauben, und das Protein aus den Zellen und/oder dem Kulturüberstand isoliert wird.
45. Antikörper gegen ein Protein oder Fragmente davon nach Anspruch 42 oder 43.
46. Nucleinsäure-Molekül von mindestens 12 Nucleotiden Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37 oder 38 hybridisiert.
47. Arzneimittel enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37 oder 38, ein Protein oder biologisch aktives Fragment davon nach Anspruch 42 oder 43, ein Nucleinsäu-

remolekül nach Anspruch 46 und/oder Antikörper nach Anspruch 44 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

48. Diagnostische Zusammensetzung enthaltend ein Nucleinsäure-Molekül nach Anspruch 37 oder 38, ein Protein oder Fragmente davon nach Anspruch 42 oder 43, ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 46 und/oder Antikörper nach Anspruch 44.

1/4

Fig. 1



2/4

Fig. 2

1 (BglI)
CCGGCGCAAACGGCGGACGCTGCTGTAGCCCCGCTTGAAACAATGTC 47
-35 -10
CGTCTGAACGCCACTTCAGACGGCATTATTTATAATAAGGCGCTGTCCTAGATAACTAGGG 107
S.D.
AAATTCAANTTAAGTTAGAATTATCCCTATGAGAAAAAGCGTCTAAGCCGGTATAAACA 167
M R K S R L S R Y K Q
AAATAAACICATTGAACGTGTTGTTCGAGGCGTAAGTGAAGAACAGCAGCAGAGCCTGA 227
N K L I E L F V A G V T A R T A A E P D
CAGCATTGTTTATACGGATTGTTATCGTCGCTATGATGTATTGGATGCGGGCGAATTTAG 287
S I V Y T D C Y R R Y D V L D A G E F S
CCATTTCGGTATCAATCAGCACACATTTTGGCGAACGACAAAACCATATTATGGAAT 347
H F R I N H S T H F A E R Q N H I N G I
TGGGAACCTTTTGAACCGGGCAAAACGTCATTACGCAAGTTTGACGGCATTCCCAAAGA 407
G N F W N R A K R H L R K F D G I P K E
GCATTTTGAGCCGTATTTAAAGGAGTGGCAACGGCGTTTTTAACAACAGTGAGATAAAAG 467
H F E P Y L K E C E R R F *
-35
TTCTTGTTCCATTTTAAACAATTAGTAAAATCGAGTTTATCCTAGTTGTCCAGGACGGC 527
S.D.
-10
CCCTAATTTATTTACAATTTTGATAACAATTGTTTTTCATCAAAGGAGAAAATCTATGCG 587
M R
GGCAGGGCTGCTGATACCTATTTCTTTTTTCGGTTTTTATTTTATCCGCTGCGGGACACT 647
A R L L I P I L F S V F I L S A (C) G T L
GACAGGTATTCCATCGCATGGCGGAGGCAAAACGCTTCGCGGTGGAACAAGAACTGTGGC 707
T G I P S H G G G K R F A V E Q E L V A
CGCTTCGCGCAGAGCTGCGTTAAAGACATGGATTTACAGGCATTACACGGACGAAAAGT 767
A S A R A A V K D M D L Q A L H G R K V
TGCATTGTACATTGCAACTATGGGCGACCAAGGTTTCAGGCAGTTTGACAGGGGGTGGCTA 827
A L Y I A T M G D Q G S G S L T G G R Y
CTCCATTGATGCACTGATTTCGGGGGAATACATAAACAGCCCTGCGTCCGCACCGATTAA 887
S I D A L I R G E Y I N S P A V R T D Y
CACCTATCCGCGTTACGAAACCACCGCTGAAACAACATCAGGCGGTTTGAAGGGTTTAAAC 947
T Y P R Y E T T A E T T S G G L T G L T
CACTTCTTTATCTACACTTAATGCCCTGCACTCTCGCGCACCCCAATCAGACGGTAGCGG 1007
T S L S T L N A P A L S R T Q S D G S G

3/4

Fig. 2 (Forts.)

AAGTAGGAGCAGTCTGGGCTTAAATATTGGCGGGATGGGGGATTATCGAAATGAAACCTT 1067
 S R S S L G L N I G G M G D Y R N E T L
 GACGACCAACCCGCGGACACTGCCTTCTTTCCCACTTGGTACAGACCGTATTTTTCCT 1127
 T T N P R D T A F L S H L V Q T V F F L
 GCGCGGCATAGACGTTGTTTCTCCTGCCAATGCCGATACAGATGTGTTTATTAACATCGA 1187
 R G I D V V S P A N A D T D V F I N I D
 CGTATTCCGAACGATACGCAACAGAACCGAAATGCACCTATACAATGCCGAAACACTGAA 1247
 V F G T I R N R T E M H L Y N A E T L K
 AGCCCAAACAAACTGGAATATTTCCGAGTAGACAGAACCAATAAAAAATTGCTCATCAA 1307
 A Q T K L E Y F A V D R T N K K L L I K
 ACCCAAACCAATGCGTTTGAAGCTGCCCTATAAAGAAAATTACGCATGTGTGGATGGGGCC 1367
 P K T N A F E A A Y K E N Y A L W M G P
 GTATAAAGTAAGCAAAGGAATCAAACCGACCGAAGGATTAAATGGTGGATTCTCCGATAT 1427
 Y K V S K G I K P T E G L M V D F S D I
 CCGGCCATACGGCAATCATACGGGTAACCTCCGCCCCATCCGTAGAGGCTGATAACAGTCA 1487
 R P Y G N H T G N S A P S V E A D N S H
 TGAGGGGTATGGATACAGCGATGAAGCAGTGGCACAACATAGACAAGGGCAACCTTGATT 1547
 E G Y G Y S D E A V R Q H R Q G Q P *

S.D.

CACACTGCCATAACCGCTTGTCTGCCAAGGAAAACAAAATGAATTTCCTATTCAAAAATT 1607
 M N L P I Q K F

CATGATGCTGTTTTCAGCGGCAATATCGTTGCTGCAAATCCCCATTAGTCATGCCAACGG 1667
 M M L F A A A I S L L Q I P I S H A N G

TTTGGATGCCCGTTTGGCGGATGATATGCAGGCAAAACACTACGAACCGGGTGGCAAATA 1727
 L D A R L R D D M Q A K H Y E P G G K Y
 CCATCTGTTCCGTAATGCTCGCGGCAGTGTAAAAATCGGGTTTGGCGCGTCCAAACATT 1787
 H L F G N A R G S V K N R V C A V Q T F
 TGATGCAACTGCGGTCCGGCCCCATCTGCCTATTACACAGAACCGGACAGGGTTTGAAGG 1847
 D A T A V G P I L P I T H E R T G F E G
 CATTATCGGTTATGAAACCCATTTTTCAGGACACGGACACGAAGTACACAGTCCGTTTGA 1907
 I I G Y E T H F S G H G H E V H S P F D
 TAATCATGATTCAAAAAGCACTTCTGATTTTCAGCGGCGCGTAGACGGCGGTTTACCGT 1967
 N H D S K S T S D F S G G V D G G F T V
 TTACCAACTTCATCGGACAGGGTCGGAAATACATCCCGCAGACGGATATGACGGGCCTCA 2027
 Y Q L H R T G S E I H P A D G Y D G P Q
 AGGCGGCGGTTATCCGGAACCAAGGGGCAAGGGATATATACAGCTACCATATCAAAGG 2087
 G G G Y P E P Q G A R D I Y S Y H I K G
 AACTTCAACCAAAACAAAGATAAACACIGTTCCGCAAGCCCCCTTTTTCAGACCGCTGGCT 2147
 T S T K T K I N T V P Q A P F S D R W L

4/4

Fig. 2 (Forts.)

AAAAGAAAATGCCGGTGCCGCTTCGGTTTTCTCAGCCGTGCGGATGAAGCAGGAAACT 2207
K E N A G A A S G F L S R A D E A G K L
GATATGGGAAAACGACCCCGATAAAAATTGGCGGGCTAACCGTATGGATGATATTGCGGG 2267
I W E N D P D K N W R A N R M D D I R G
CATCGTCCAAGGTGCGGTTAATCCTTTTTTAAACGGTTTTTCAGGGATTGGGAGTTGGGGC 2327
I V Q G A V N P F L T G F Q G L G V G A
AATTACAGACAGTGGCGTAAGCCCGGTAACCTATGCGGCAGCACGGAAAACTTTACAGGG 2387
I T D S A V S P V T Y A A A R K T L Q G
TATTCACAATTTAGGAAATTTAAGTCCGGAAGCACAACTTGCCGCCGCGAGCCTATTACA 2447
I H N L G N L S P E A Q L A A A S L L Q
GGACAGTGCCTTTGCGGTAAAAGACGGCATCAATTCGCCAGACAATGGGCTGATGCCCA 2507
D S A F A V K D G I N S A R Q W A D A H
PstI
TCCGAATATAACAGCAACAGCCCAAACCTGCCCTTGCCGTAGCAGAGGCTGCAGGTACGGT 2567
P N I T A T A Q T A L A V A E A A G T V
TTGGGGAGGTAAAAAGTAGAACTTAACCCGACCAATGGGATTGGGTTAAAAATACCGG 2627
W G G K K V E L N P T K W D W V K N T G
CTATGAAAAACCTGCTGCCCGACCTATGCAGACTGTAGACGGGGAAATGGCCGGGAAAAA 2687
Y E K P A A R P M Q T V D G E M A G K N
TAAGCCACCGAAACCAAGTACGACGCAACACTCTACACACTCTGATAACAATATCGGCTT 2747
K P P K P S T Q Q H S T H S D N N I G L
ACCTGCCCATATGTTAAACCTGATACATCTATTTCTCCGACAGGAACAATTCAAGACCG 2807
P A P Y V K P D T S I S P T G T I Q D R
CATCAGATGGACAAAATCCAAGTTTCCCTACTGAGAAATCTTTAAATGGACATTTCAAAGC 2867
I R W T K S K F P T E K S L N G H F K A
TCATGGAAAAGAATTGGCGATATAACCATTGAAGACTACCAAAAAATGGCGTCTGATTT 2927
H G K E F G D I T I E D Y Q K M A S D L
GTTATCAAAACAGACATCGGACAAGATATTAGGTTATCAGACGGAACATAGACGAGTGG 2987
L S K Q T S D K I L G Y Q T E H R R V R
CTATGATATCAATAACAATATCTATGTTTGGCCAATCCAAAAACATTCAAAATCAAAAC 3047
Y D I N N N I Y V L A N P K T F K I K T
Eco RI
AATGTTTAAACCAAACCTTAGGAAAGGAGTATTATGATGGAGCAATTCAAAAAGACATGGG 3107
M F K P N L G K E Y Y D G E F K K D M G
AAATTGACGGAGAAATATGGCTACATGTGCTGTTGCGGAACCTGAAGTTATGGACTATG 3167
N *
ATATCTGTGACGTTTGTTCAGTGGCAAATAACAGGAGAACTAATATAGATGGTGGTCCTA 3227
HindIII
ATGAAATGACACTTGGCGAGCGGAAAGAGCTTACGCAAAAGGCTTACCAATCAGATAAA 3287

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 96/04092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	C12N15/31 C07K16/12	C12N15/70 A61K39/095
C12N1/21 A61K39/40	C12Q1/68 G01N33/569	C07K14/22
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12N C12Q C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 43 36 530 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 13 April 1995 see the whole document	1-48
A	WO 92 13871 A (UNIV WASHINGTON) 20 August 1992 see the whole document	1-48
A	CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, vol. 8, no. 3, July 1995, pages 376-388, XP000644345 NASSIF X. AND SO M.: "Interaction of pathogenic Neisseriae with nonphagocytic cells" see the whole document	1-48
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 February 1997		26.02.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/04092

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PNAS, U.S.A., vol. 87, no. 1, January 1990, pages 333-337, XP002024933 PARUCHURI D. ET AL.: "Identification and characterization of a Neisseria gonorrhoeae gene encoding a glycolipid-binding adhesin" see the whole document -----</p> <p><i>PNAS</i> <i>1990</i> <i>vol. 87 no. 1</i> <i>333-337 Jan</i></p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/04092

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-C-4336530	13-04-95	AU-A- 7939894	22-05-95
		WO-A- 9511919	04-05-95
		EP-A- 0725792	14-08-96

WO-A-9213871	20-08-92	AU-A- 1411492	07-09-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen
PCT/EP 96/04092

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/31 C12N15/70 C12N1/21 C12Q1/68 C07K14/22
C07K16/12 A61K39/095 A61K39/40 G01N33/569

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C12Q C07K A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 43 36 530 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 13. April 1995 siehe das ganze Dokument	1-48
A	WO 92 13871 A (UNIV WASHINGTON) 20. August 1992 siehe das ganze Dokument	1-48
A	CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Bd. 8, Nr. 3, Juli 1995, Seiten 376-388, XP000644345 NASSIF X. AND SO M.: "Interaction of pathogenic Neisseriae with nonphagocytic cells" siehe das ganze Dokument	1-48

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PNAS, U.S.A., Bd. 87, Nr. 1, Januar 1990, Seiten 333-337, XP002024933 PARUCHURI D. ET AL.: "Identification and characterization of a Neisseria gonorrhoeae gene encoding a glycolipid-binding adhesin" siehe das ganze Dokument -----</p>	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04092

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-C-4336530	13-04-95	AU-A- 7939894	22-05-95
		WO-A- 9511919	04-05-95
		EP-A- 0725792	14-08-96
<hr/>			
WO-A-9213871	20-08-92	AU-A- 1411492	07-09-92
<hr/>			